



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

BIOLOGÍA

BIOLOGÍA MOLECULAR

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER

Efecto antitumoral del esteroide β -D-glucopiranosido de (25R)-6-oxo-5 α -espirostan-3 β -ilo (Laxogenina-glicosilada) en líneas celulares de cáncer cérvico-uterino HeLa, CaSki y ViBo

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:
BETZABE GUADALUPE DE GYVES GUTIÉRREZ

DIRECTOR DE TESIS

M. en C. Luis Sánchez Sánchez

México D.F. 2012





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mi Universidad, por todo lo que me ha dado.

*“El Biólogo, por excelencia es un gran amante de la vida,
pues él se preocupa por comprenderla y se ocupa de
descubrir sus misterios”*

Gracias...

A mi Mamá, por superar conmigo toda adversidad y enseñarme que la verdadera grandeza se lleva en la nobleza del espíritu. Por todo tu esfuerzo y dedicación mis logros también son tuyos.

A mis Abuelos, por su interés en mi bienestar, su profundo afecto, sus cuidados y sobretodo por quererme como a una hija.

A mi pequeño hermano Omar, por alegrarme cada día y contagiarme de su actitud positiva; y a Oscar, por el afecto y apoyo incondicional que me ha brindado desde niña.

A mi Familia, a la que tanto valoro por demostrarme que por encima de todo, una familia unida fortalece y enriquece al ser humano.

A Luis Ángel, por encontrar siempre la forma de hacerme sonreír, por ser mi mejor amigo, respetar mi espacio y compartir conmigo su tiempo y sus ideales. Gracias por llegar a mi vida.

A mis Amigos, Casandra, Javier, Alexis, Berenice, Arturo, Gisela, Moisés, Israel, Hugo, Iván y Roberto, gracias por dejarme conocerlos, gracias por las risas, los gestos, las fotos, los consejos, las bromas, los conflictos, los abrazos, la diversión y todas las inolvidables experiencias.

A mi Maestro Luis Sánchez Sánchez, por permitirme ser parte de su laboratorio, por todas sus enseñanzas, su paciencia y sobretodo, por que más allá de preocuparse por formar excelentes investigadores se preocupa por formar excelentes seres humanos.

Al Dr. Benny Weiss Steider, por todas sus aportaciones para optimizar mi trabajo.

A la Dra. Hortensia Rosas Acevedo, por sus previas enseñanzas y por sus contribuciones para enriquecer éste trabajo.

A mis Maestros, Hugo López Muñoz y J. M. Vicente Hernández Vázquez por sus enseñanzas durante mi formación en el laboratorio, su paciencia y sus valiosas aportaciones para concluir ésta Tesis.

A la Dra. María Luisa Escobar Sánchez, por su colaboración técnica en los ensayos inmunocitoquímicos de éste trabajo y por compartirme su experiencia y conocimientos.

A la Dra. María Antonieta Fernández Herrera y al Dr. Jesús Sandoval Ramírez, investigadores del laboratorio de síntesis química de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por sintetizar y otorgar el compuesto para realizar éste trabajo.

Al Dr. René García Sánchez, jefe de enseñanza del hospital regional Ignacio Zaragoza del ISSSTE, y al Dr. Dionisio Parra Roldán jefe del departamento de ginecología y perinatología del hospital regional Ignacio Zaragoza del ISSSTE, por habernos facilitado las muestras de cuello uterino con las que se realizó éste trabajo.

Ésta Tesis fue realizada con apoyo del proyecto PAPIME: PE 206812 y del proyecto CONACYT 84380.

Índice

Resumen ► 1

Marco Teórico ▼

- La célula → 2
- Ciclo celular → 3
- Muerte celular → 7
- Cáncer → 11
- Cáncer cérvico-uterino → 12
- Las saponinas esteroidales y la laxogenina-glicosilada → 17

Planteamiento del Problema ► 20

Justificación ► 21

Hipótesis ► 22

Objetivos ► 23

Material y Métodos ► 24

Resultados ▼

- Efecto antiproliferativo (CI_{50}) → 32
- Efecto en el ciclo celular → 34
- Actividad antiproliferativa en células linfocíticas humanas no tumorales → 37
- Inducción de necrosis en células tumorales → 38
- Inducción de necrosis en células linfocíticas humana no tumorales → 39
- Efecto apoptótico en células tumorales → 40
- Expresión de caspasa 3 activa → 43
- Fragmentación de ADN → 46

Discusión de Resultados ► 49

Conclusiones ► 52

Referencias ► 53

Apéndice ► 56

Resumen

Actualmente el cáncer es la primera causa de muerte a nivel mundial, particularmente el cáncer cérvico-uterino se ubica como la segunda causa de muerte en la población femenina tanto a nivel mundial como nacional. Como tratamientos para ésta enfermedad principalmente se utilizan la quimioterapia y radioterapia, los cuales, desafortunadamente presentan selectividad limitada entre células tumorales y células normales, además de ser ineficientes en estados avanzados de la enfermedad, generando como consecuencia efectos secundarios en los pacientes, deteriorando su calidad de vida. Es por eso que en la investigación científica existe un fuerte interés por conocer compuestos alternativos de origen vegetal, capaces de atacar dicha enfermedad mostrando selectividad celular sin causar efectos secundarios. Entre éstos compuestos se encuentran las saponinas esteroidales, las cuales poseen diversas actividades biológicas, entre las que destaca su actividad antitumoral. La laxogenina-glicosilada es una saponina esteroidal, a la cual se le atribuye actividad antiproliferativa en células tumorales de cáncer cérvico-uterino, sin embargo se desconoce su capacidad selectiva y apoptótica. El objetivo de éste trabajo fue evaluar la actividad antiproliferativa y apoptótica de dicha saponina, así como su efecto en el ciclo celular de las líneas de cáncer cérvico-uterino HeLa, CaSki y ViBo. Los resultados obtenidos mostraron que el esteroide afecta el potencial proliferativo de las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo de una manera dosis dependiente con una CI_{50} de 57, 71 y 100 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. El marcaje del ADN con yoduro de propidio en las células tumorales para la determinación del efecto en el ciclo celular, sugiere que la actividad antiproliferativa de la laxogenina-glicosilada puede ser dependiente o independiente del ciclo celular. Por otro lado, la nula detección de la LDH en los sobrenadantes de células tumorales así como no tumorales, sugiere que el fitoesteroide no induce muerte necrótica. Sin embargo, la observación de la disminución del tamaño celular y de cuerpos apoptóticos, la detección de la caspasa 3 activa, así como la detección de la fragmentación de ADN en los cultivos de células tumorales tratadas con la saponina, indican que el compuesto induce a dichas células a una muerte por apoptosis. Por lo anterior la laxogenina-glicosilada podría ser un candidato para ser evaluado como agente terapéutico, con acción selectiva contra el cáncer.

Marco Teórico

La Célula

Todos los organismos vivos están constituidos por células. La célula es la unidad morfológica y funcional de todos los organismos, es la unidad básica de la vida, microorganismos como las bacterias, levaduras y amibas existen como células individuales; por el contrario, un ser humano adulto está constituido por unos 30 billones de células, la mayoría de las cuales están organizadas en colectivos, denominados tejidos (Bolsover *et al.*, 2004).

Las células son pequeños compartimientos rodeados de membrana y llenos de una solución concentrada de sustancias químicas, y superficialmente muestran una diversidad asombrosa; pero a pesar de todas las diferencias entre ellas sólo existen dos tipos celulares: procariotas y eucariotas. Las células bacterianas se denominan procariotas, del griego *antes del núcleo* porque presentan una escasa organización interna, poseen ribosoma pero carecen de citoesqueleto y sistemas de endomembranas y el material genético está libre dentro de la célula; además de ser células pequeñas, ya que la gran mayoría mide unos 1-2 μm de longitud. Las células del resto de los organismos, desde protistas a mamíferos, hongos o plantas, son eucariotas, del griego *núcleo verdadero*, éstas son generalmente mayores ya que miden de 5-10 μm de longitud; algunas son estructuralmente más complejas y lo suficientemente grandes como para ser vistas por el ojo humano. Las células eucariotas mantienen su material genético envuelto dentro de una bicapa lipídica, denominada envoltura nuclear, presentan un citoesqueleto dinámico y bien estructurado, y en el citoplasma se pueden distinguir muchos orgánulos característicos, además de poseer una organización celular principalmente pluricelular con diferenciación de muchos tipos celulares. Todas las células que componen un mismo organismo comparten el mismo conjunto de instrucciones genéticas en su núcleo. Sin embargo, todas las células no son idénticas, las plantas y los animales están compuestos por diferentes tejidos, grupos de células especializadas para llevar a cabo una función común. Esta especialización tiene lugar

porque diferentes tipos celulares leen diferentes partes de la información contenida en el ADN, fabricando, por tanto, diferentes proteínas. Los animales poseen cuatro grandes tipos de tejidos: tejido conjuntivo, tejido nervioso, músculo y epitelio. Los tejidos conjuntivos proporcionan en soporte esencial para el resto de los tejidos corporales, contiene relativamente pocas células dentro de un gran volumen de matriz extracelular, que consiste en diferentes tipos de fibras incrustadas en una sustancia basal amorfa donde la fibra más abundante es el colágeno. El tejido nervioso es un epitelio altamente modificado, compuesto por muchos tipos celulares, entre éstos el más importante son las células nerviosas, o neuronas, junto con las diversas células acompañantes que ayudan a su manutención. El tejido muscular puede ser de dos tipos: liso o estriado; las células del músculo liso son largas y delgadas y se encuentran, normalmente, en las paredes de los órganos tubulares, mientras que las células del músculo estriado cardíaco forman las paredes de las aurículas de los ventrículos del corazón. Finalmente, el epitelio son láminas de células que recubren la superficie del cuerpo y limitan las cavidades internas como las de pulmones e intestino, éstas son las células columnares o escamosas, la superficie luminal de estas células presenta microvellosidades, que aumentan todavía más al área de esta superficie; la superficie basal se asienta sobre una capa de soporte de fibras extracelulares denominada lámina basal (Bolsover *et al.*, 2004).

Ciclo Celular

Toda célula surge de la división de una célula preexistente. Muchas células presentan una alternancia continua entre división y no división; lo que sucede desde que termina una división hasta que comienza la división siguiente constituye el ciclo celular, el cual, para las células somáticas está integrado por dos etapas bien definidas: la interfase y la mitosis [figura 1] (Klug *et al.*, 2006).

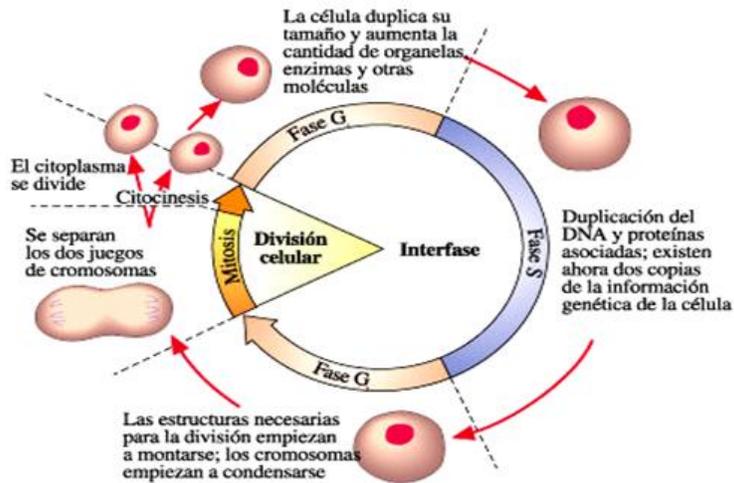


Figura 1. Esquema de fases del ciclo celular, (preujct.cl/biologia/curtis/libro/img/10-5).

➤ Interfase.

El estadio inicial del ciclo, llamado interfase, puede considerarse como el intervalo entre dos divisiones. La actividad bioquímica en la interfase se dedica al crecimiento celular y su funcionamiento normal, así como la replicación del ADN de cada cromosoma. El periodo en el que se sintetiza en ADN se denomina fase S y tiene lugar antes de que la célula inicie la mitosis. Existen dos periodos durante la interfase, antes y después de la fase S, en los que no se sintetiza ADN. Estas fases se denominan G1 (gapI) y G2 (gapII) respectivamente. En ambas fases, así como durante la fase S, hay intensa actividad metabólica, crecimiento y diferenciación celular. Hacia el final de la G2, el volumen celular prácticamente se ha duplicado, el ADN se ha replicado y se ha iniciado la mitosis (M). Después de la mitosis las células que están continuamente dividiéndose, repiten este ciclo (G1, S, G2, M) una y otra vez. En un momento tardío de la fase G1, todas las células siguen uno de estos dos caminos. O bien abandonan el ciclo y entran en una fase de reposo (G0), o bien son obligadas a iniciar la síntesis de ADN y completar el ciclo. Las células que entran en G0 permanecen viables y activas metabólicamente, pero no se dividen. Hay células que entran en G0 y nunca reinician el ciclo celular, o permanecen en G0 y siendo estimuladas vuelven a G1, continuando el ciclo celular. Citológicamente la interfase se caracteriza por la ausencia de cromosomas

visibles; en su lugar es evidente que el núcleo diferenciado está lleno de fibras de cromatina, que se han formado a medida que los cromosomas se han desespiralizado y dispersado después de la mitosis anterior. Una vez que se han completado G1, S y G2, se inicia la mitosis (Klug *et al.*, 2006).

➤ Mitosis.

La mitosis es un periodo dinámico de actividad continua y vigorosa. Todo el proceso se subdivide en fases discretas y se asignan sucesos concretos a cada una; estos estadios, en orden secuencial, son la profase, prometafase, metafase, anafase y telofase (Klug *et al.*, 2006).

Profase. A menudo, la profase dura la mitad de la mitosis, una fase que se caracteriza por diversas actividades esenciales. Uno de los hechos más tempranos de la profase en todas las células animales es la migración de dos pares de centriolos hacia extremos opuestos de la célula. La migración de los centriolos es tal que se establecen dos polos en extremos opuestos de la célula, una vez que han migrado, los centriolos son responsables de la organización de los microtúbulos citoplásmicos, lo que da lugar a una serie de fibras del uso que van de polo a polo, dando lugar a un eje, a lo largo del cual se separan los cromosomas. A medida de que los centriolos migran, la envoltura nuclear comienza a descomponerse y desaparecer gradualmente, de igual manera los nucléolos del interior del núcleo se desintegran; mientras, las fibras de la cromatina difusa comienzan a condensarse hasta que se hacen visibles los cromosomas. Cerca del final de la profase cada cromosoma es una estructura doble, dividida longitudinalmente, excepto en una constricción puntual, el centrómero; cada una de las dos partes del cromosoma se denominan cromátidas, ya que el ADN que contiene cada par de cromátidas es el resultado de la duplicación de un único cromosoma, éstas son genéticamente idénticas por lo que se denominan cromátidas hermanas (Klug *et al.*, 2006).

Prometafase y Metafase. El hecho diferencial en la siguiente fase es la migración de cada cromosoma, dirigida de la región centromérica hacia el plano ecuatorial. El término prometafase se refiere al periodo en que los cromosomas se desplazan, y la metafase se aplica a la configuración cromosómica que aparece después de esta migración, la cual se hace posible por la unión de las fibras del huso a una estructura asociada con el centrómero de los cromosomas llamada cinetocoro, la cual se asocia con las dos cromátidas hermanas de cada cromosoma. Una vez unidos a los microtúbulos que forman las fibras del huso, las cromátidas hermanas están listas para ser atraídas a los polos opuestos en el siguiente estadio (Klug *et al.*, 2006).

Anafase. En esta fase que es la más breve, las cromátidas hermanas de cada cromosoma se separan y migran hacia los extremos opuestos de la célula; para que se de una separación completa, cada región centromérica tiene que dividirse en dos, hecho que indica el inicio de la anafase. Una vez que ha ocurrido esto, cada cromátida se denomina cromosoma hijo. Los pasos que ocurren en la anafase son esenciales para proporcionar a cada célula hija una dotación idéntica de cromosomas, (Klug, 2006).

Telofase. Es la fase final de la mitosis, en su comienzo hay dos dotaciones completas de cromosomas, una en cada polo; el hecho más significativo es la citocinesis, la división o partición del citoplasma. Las células sufren una constricción del citoplasma, y el resultado final es la formación de dos células independientes (Klug *et al.*, 2006).

➤ Puntos de control del ciclo celular.

En las células normales, la progresión a través del ciclo celular esta estrictamente regulada. Hay al menos tres puntos diferentes del ciclo celular en los que la célula examina su equilibrio interno antes de continuar con el siguiente estadio del ciclo celular. Estos puntos de control se encuentran en G1/S, en G2/M y en M. En el punto de control G1/S, la célula examina su tamaño y determina si su ADN ha sido dañado; si

la célula no ha alcanzado su tamaño adecuado, o si su ADN está dañado se detiene su marcha por el ciclo celular hasta que se corrijan estas condiciones. Si tanto el tamaño celular como la integridad del ADN son normales, se supera el punto de control G1/S y la célula entra en fase S. En el segundo punto de control G2/M, la célula examina sus condiciones fisiológicas antes de entrar en mitosis; si no se ha completado la replicación del ADN o la reparación de los daños que pueda tener, el ciclo celular se detiene hasta que se completen estos procesos. En el punto de control M, se examina la formación del sistema de fibras de huso acromático y la unión de estas fibras a los cinetocoros asociados a los centrómeros; si las fibras de huso no se han formado adecuadamente, o la unión de los cinetocoros no es correcta, se detiene la mitosis (Klug *et al.*, 2006).

Muerte Celular

Los organismos pluricelulares no crecen indefinidamente, porque la proliferación celular está en equilibrio con la muerte celular. Existen diversos tipos de muerte celular, entre éstos los más comunes y por ende los más estudiados son denominados apoptosis y necrosis [figura 2] (Bolsover *et al.*, 2004).

Apoptosis.

Si la replicación o la reparación del ADN o el ensamblaje de los cromosomas son aberrantes, la célula detiene su progresión por el ciclo celular hasta que se corrige esta condición. Esto reduce el número de mutaciones y de anomalías cromosómicas que se acumulan en las células en proliferación. Sin embargo, si el daño en el ADN o en los cromosomas es tan grave, que no se puede reparar, la célula puede iniciar una segunda línea defensiva, un proceso denominado apoptosis o muerte celular programada. La apoptosis es un proceso controlado genéticamente en el que la célula se autodestruye (Klug *et al.*, 2006).

La apoptosis implica una serie específica de procesos que conducen al desmantelamiento de los contenidos internos de la célula. Durante las primeras fases de la apoptosis, el ADN de las células es segregado cerca de la periferia del núcleo y el volumen del citoplasma disminuye. A continuación la célula comienza a producir pequeñas evaginaciones citoplásmicas esféricas “blebs”, el núcleo y los orgánulos comienzan a fragmentarse. El ADN de las células es seccionado a intervalos regulares por una endonucleasa de ADN específica de apoptosis “DNasa” (enzima que dirige al ADN). Como consecuencia los fragmentos de ADN que tienen longitudes que son múltiplos de 200 pares de bases, constituyen una “escalera” de fragmentos con utilidad diagnóstica. Finalmente la célula es destruida en pequeñas piezas llamadas “cuerpos apoptóticos”. Los restos de la célula afectada son eliminados por otras células vecinas (generalmente macrófagos) mediante fagocitosis (Becker *et al.*, 2007).

Al eliminar las células dañadas, la muerte celular programada reduce el número de mutaciones que se propagan a la siguiente generación, incluidas las de los genes que causan cáncer; los mismos genes que regulan el control del ciclo celular pueden estimular la apoptosis (Klug *et al.*, 2006).

Las moléculas responsables de iniciar la apoptosis y de dirigir los componentes intracelulares son un grupo de proteasas denominadas caspasas, las cuales reciben este nombre debido a que contienen una cisteína en su sitio activo, e hidrolizan proteínas en sitios que contiene residuos de aspártico seguidos de cuatro aminoácidos que son específicos para cada caspasa (Sánchez, 2001). Las caspasas son producidas como precursores inactivos llamados procaspasas que son posteriormente hidrolizados para generar enzimas activas, frecuentemente por otras caspasas en una cascada proteolítica; una vez que se activan, las caspasas fragmentan otras proteínas dentro de las células, lo que produce la muerte eficiente y precisa de la célula en la que se activan (Bolsover *et al.*, 2004).

La apoptosis se puede dividir en fase de iniciación, cuando las caspasas se activan y en una fase de ejecución, cuando las enzimas causan la muerte celular (Stevens & Lowe, 2001). Existen dos vías alternativas para activar a las caspasas: una es disparada por cambios en la integridad mitocondrial, denominada vía intrínseca, y la otra es iniciada por señales externas al activar a un receptor de muerte en la superficie celular, denominada vía extrínseca (Jiménez & Merchant, 2003).

En una célula saludable que no ha entrado en apoptosis, están presentes numerosas proteínas antiapoptóticas en la membrana mitocondrial externa que evitan la apoptosis, pero únicamente mientras la célula está expuesta a factores de crecimiento. Éstas proteínas están relacionadas estructuralmente con una proteína antiapoptótica mejor conocida como Bcl-2, la cual junto con otras proteínas antiapoptóticas produce sus efectos contrarrestando a otras proteínas que son similares estructuralmente a Bcl-2, pero que promueven la apoptosis, éstas se denominan proteínas proapoptóticas como las llamadas Bax y Bad, las cuales se pueden insertar en la membrana externa mitocondrial, pero únicamente lo hacen de manera significativa cuando no están presentes los factores tróficos. Así las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas emprenden una batalla en muchas células y cuando el balance se inclina hacia las proteínas proapoptóticas es más probable que la célula sufra apoptosis. Otra situación que puede desencadenar la vía mitocondrial de apoptosis, ocurre cuando una célula sufre un daño que es incapaz de reparar llevándola a desencadenar su propia muerte. En particular, cuando el ADN de la célula es dañado puede entrar en apoptosis mediante la vía de una proteína conocida como p53 (importante regulador del ciclo celular), la cual puede activar proteínas proapoptóticas para desencadenar la apoptosis (Becker *et al.*, 2007).

➤ Necrosis.

A diferencia de la apoptosis ésta es un tipo de muerte accidental, resultante de un daño mecánico o por la exposición a un agente tóxico, además de que, la célula que muere activa el sistema inmunitario del huésped (Bolsover *et al.*, 2004).

El origen de las alteraciones necróticas es un desequilibrio osmótico; la permeabilidad de la membrana plasmática se altera y se establece un flujo anormal de iones hacia el interior (principalmente de iones de calcio) que va acompañado de la entrada pasiva de agua. El volumen celular aumenta y algunas rutas metabólicas se alteran debido a las nuevas concentraciones iónicas que se establecen. Así la mayor concentración intracelular de calcio inhibe la producción de ATP a la vez que estimula la síntesis de algunas enzimas proteolíticas, la cromatina nuclear pierde su conformación original y constituye pequeños agregados, mientras que algunos orgánulos membranosos, como el retículo endoplásmico o las mitocondrias, se dilatan por la entrada de agua, los ribosomas se desorganizan y los lisosomas se rompen. Como etapa final, los orgánulos estallan, la membrana plasmática y la envoltura nuclear se fragmentan y el contenido intracelular se vierte al exterior promoviendo una respuesta inflamatoria, posteriormente las células fagocíticas degradan los restos (Paniagua *et al.*, 2007).

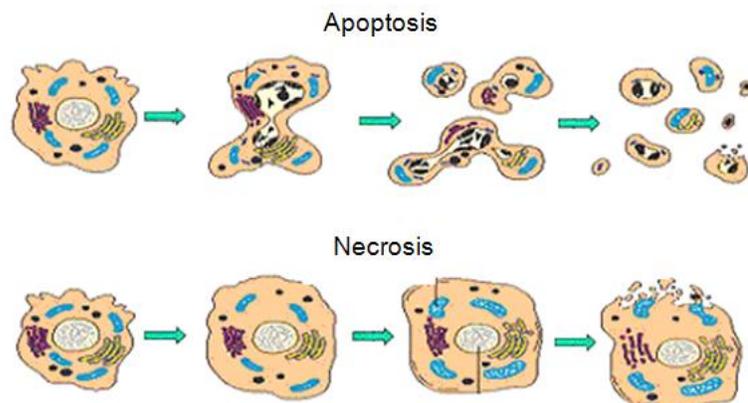


Figura 2. Esquema de dos tipos de muerte celular, (www.nature.com/html).

La Lactato Deshidrogenasa (LDH) es una enzima catalizadora que se encuentra en muchos tejidos del cuerpo, pero su presencia es mayor en el corazón, hígado, riñones, músculos, glóbulos rojos, cerebro y pulmones; corresponde a la categoría de las oxidorreductasas, dado que cataliza una reacción redox, en la que el piruvato es reducido a lactato, está presente en el citoplasma y se libera al medio al romperse la membrana celular por lo que al ser detectada extracelularmente se comprueba que la célula murió por necrosis (Karp *et al.*, 2006).

Cáncer

El término cáncer, proviene de *cangrejo* en latín, fue acuñado por Hipócrates en el siglo V a.C. para describir enfermedades en las que los tejidos crecen y se diseminan de manera incontrolada por todo el organismo (Bolsover *et al.*, 2004).

Todas las células cancerosas comparten dos propiedades fundamentales: 1) un crecimiento y división anormal (proliferación celular desmesurada), y 2) anomalías en las restricciones normales que evitan que las células se propaguen e invadan otras partes del cuerpo (metástasis) (Klug *et al.*, 2006).

Un cáncer es un tipo de crecimiento tisular anormal en donde las células se dividen de manera relativamente autónoma e incontrolada conduciendo a un aumento progresivo del número de células en división. La masa resultante del tejido en crecimiento se denomina tumor o neoplasma. La división celular está cuidadosamente equilibrada con la diferenciación celular, de manera que no tenga lugar una acumulación neta de células en división; en los tumores se rompe esta organización finamente equilibrada y la división celular se desacopla de la diferenciación celular. Los tumores se clasifican como benignos o malignos; un tumor benigno crece en un área delimitada y localizada y raramente es peligroso, mientras que un tumor maligno es capaz de invadir los tejidos circundantes, de entrar en el torrente circulatorio, y de diseminarse hacia varias partes del cuerpo, a esto se le denomina metástasis, y es lo que lo convierte en una grave amenaza para la salud, ya que según se acumulan las células en división se altera gradualmente la organización y función normales del tejido. Por lo que el cáncer se refiere a cualquier tumor maligno, es decir, capaz de diseminarse desde su localización original hacia otros sitios; esto hace del cáncer una enfermedad que potencialmente amenaza la vida (Bolsover *et al.*, 2004).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que la principal causa de muerte en el mundo durante 2008 fue el cáncer, con 7.6 millones de casos, lo cual equivale al 13% de todas las muertes a nivel mundial, de las cuales más del 72% se

registran en países de ingresos bajos y medios, principalmente por cáncer de pulmón, estómago, hígado, colon y mama. En México durante 2009, murieron 65 de cada 100 mil personas a consecuencia de tumores malignos (INEGI, 2012).

Se prevé que entre 2007 y 2030, aumentará 45% la mortalidad por cáncer a nivel mundial, pues se estima que pasara de 7.6 a 11.5 millones de defunciones por año, resultado del crecimiento demográfico y el envejecimiento de la población; además, se estima que durante el mismo periodo el número de casos nuevos de cáncer aumentará de 11.3 a 15.5 millones (OMS, 2011).

➤ Tipos de Cáncer.

El cáncer se puede originar en cualquier órgano, dependiendo del tipo celular implicado se agrupan en varias categorías diferentes. Carcinomas, entre los que se encuentran cerca del 90% de todos los cánceres, surgen a partir de células epiteliales que cubren las superficies corporales externas e internas. Sarcomas, se desarrollan a partir de tejidos de soporte tales como hueso, cartílago, grasa, tejido conjuntivo y músculo. Finalmente los linfomas y leucemias surgen a partir de células de origen sanguíneo y linfático, reservándose el término leucemia para situaciones en las que las células cancerígenas residen y proliferan principalmente en el torrente circulatorio más que creciendo como masas sólidas de tejido (Bolsover *et al.*, 2004).

Cáncer cérvico-uterino

La observación de que a menudo el cáncer se desarrolla en pasos sucesivos, de células ligeramente aberrantes a células cada vez más tumorigénicas y malignas, apoya la naturaleza en múltiples pasos del desarrollo de esta enfermedad. El desarrollo de cáncer cérvico-uterino [figura 3] (que proviene de la palabra en latín *cuello*) ilustra ésta naturaleza progresiva del cáncer. El cuello uterino es la parte inferior y estrecha del útero que conecta al útero con la vagina (Bolsover *et al.*, 2004).

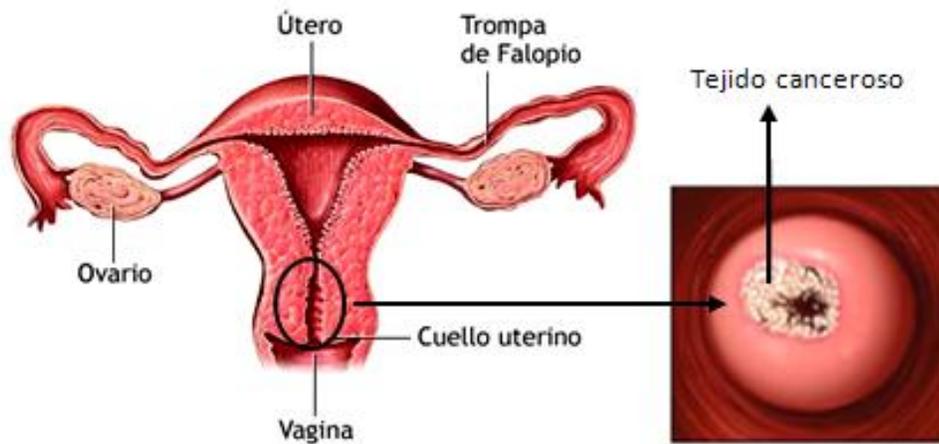


Figura 3. Carcinoma cérvico-uterino, (www.i/ar-fem/cu).

En un cuello uterino normal, las células de la capa basal se dividen y se diferencian en células quiescentes que con el tiempo salen de la superficie, algunas veces las células de la capa basal pierden la capacidad de diferenciarse y convertirse en quiescentes. Estas áreas con células que se dividen de manera anormal se denominan displasias, si un área de displasia continua así durante años se convierte en lo que se denomina un carcinoma *in situ*. Hasta éste estadio, tratar de curar un carcinoma es relativamente sencillo. Sin embargo, del 20 al 30 por ciento de los casos los carcinomas *in situ* progresan gradualmente hasta la malignidad completa, caracterizada por células que se desprenden del tumor, atraviesan la lámina basal e invaden los tejidos adyacentes; en estos estadios tardíos, es mucho más difícil tratar un cáncer cérvico-uterino invasivo (Klug *et al.*, 2006).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer cérvico-uterino es el segundo tipo de cáncer más frecuente en la mujer, y prácticamente todos los casos están relacionados con la infección genital por virus del papiloma humano (VPH). Cerca de un 80% de los casos y una proporción aún mayor de las muertes por esta causa se registran hoy en países de bajos ingresos, donde prácticamente no hay acceso a la detección y tratamiento de esta enfermedad (OMS 2011).

➤ Cáncer cérvico-uterino en México.

En el año 2009, el porcentaje más alto de incidencia de cáncer cérvico-uterino en México, se presentó en mujeres de 35 a 59 años de edad, principalmente en la población de 45 a 49 años (15.1%), seguido de las mujeres de 40 a 44 años (14%) y de las de 50 a 54 años (13.2%); y es considerado como la segunda causa de muerte en la población femenina, representando el 12.1% del total de mortalidad por cáncer en mujeres mexicanas (INEGI, 2012).

➤ Causas de cáncer cérvico-uterino.

Las posibles causas de cáncer cérvico-uterino son:

- Infección por VPH (principalmente subtipos considerados oncogénicos).
- Infecciones de transmisión sexual.
- Infecciones vaginales tratadas inadecuadamente.
- Antecedentes genéticos de cáncer y específicamente cáncer cérvico-uterino.
- Inicio de práctica sexual antes de los 18 años.
- Fumar. (OMS 2011).

➤ Prevención.

Para prevenir la formación de cáncer cérvico-uterino es recomendable:

- Realizar el examen de Papanicolaou cada año a partir de los 18 años, y cada seis meses a partir de los 35 años o si existen antecedentes genéticos de cáncer.
- Respetar el periodo de cuarentena después del alumbramiento.
- No fumar.
- Llevar una práctica sexual segura.
- Hacer ejercicio y mantener una dieta sana. (OMS 2011).

➤ Diagnóstico.

Los exámenes para diagnosticar el cáncer cérvico-uterino son los siguientes:

- *Examen de Papanicolaou.* Detecta cáncer cérvico-uterino así como tejidos precancerosos en él, llamada displasia cervical.
- *Colposcopia.* Examinación de la vagina y cuello uterino, se indica si el examen de Papanicolaou sugiere displasia cervical (precáncer) o neoplasia cervical (cáncer).
- *Examen de VPH.* Se puede examinar el mismo material de la prueba de Papanicolaou para detectar tipos de VPH (principalmente tipos considerados oncogénicos).
- *Biopsia.* Se realiza si el examen de Papanicolaou resulta positivo a displasia o neoplasia, y consiste en realizar un corte del cuello uterino para ser examinado y determinar el grado NIC (neoplasia intracervical) del tejido. (OMS 2011).

➤ Tratamiento.

Existen tres principales tratamientos:

- *Cirugía.* Es el método más empleado para aquellos tumores pequeños y localizados en un lugar específico y posible de someter a cirugía. Consiste en extirpar el tumor cancerígeno, para obtener un mejor resultado se precisa extirpar parte del tejido que rodea al tumor, para así, asegurar que todas las células cancerosas han sido extirpadas; sin embargo esto no le asegura totalmente al paciente que más adelante el cáncer reaparezca (Cameron *et al.*, 2005).
- *Radioterapia.* Utiliza partículas de alta energía capaces de penetrar al cuerpo y destruir células cancerosas o aminorar su crecimiento; esto lo hace a través de una máquina, llamada acelerador lineal, que genera y dirigen esas partículas hacia el lugar del cuerpo donde se localiza el cáncer. Al irradiar las células con

enormes cantidades de partículas de energía, provoca modificaciones profundas, principalmente al nivel del núcleo celular, y de ello resultan perturbaciones que pueden destruirlas o hacerlas incapaces de reproducirse. La desventaja de la radioterapia, es que lesiona todas las células que se encuentran en el haz, sin distinción entre células normales o malignas; y a pesar de las precauciones tomadas, no puede evitarse la irradiación de los tejidos sanos (Cameron *et al.*, 2005).

- *Quimioterapia.* Actúa sobre las células que se dividen con gran rapidez, que es lo que suelen hacer las cancerosas. Pero también existen otras células, que no son cancerosas y que también se dividen de forma rápida. Algunos medicamentos quimioterapéuticos actúan interrumpiendo la fase donde la célula cancerosa se divide y esto hace que el tiempo de crecimiento sea mayor y que la célula muera. Los medicamentos quimioterapéuticos pueden administrarse de diferentes formas: a través de un comprimido por vía oral; mediante un suero o inyección intravenosa; por inyección intramuscular o mediante una inyección a través de una punción en la médula ósea. Los medicamentos quimioterapéuticos al actuar sobre células que se dividen con frecuencia, como lo hacen las células cancerosas, también pueden actuar sobre aquellas células normales que igualmente se dividen con frecuencia. Estas células son por ejemplo, las células de la médula ósea (donde se fabrican las células sanguíneas) y las membranas mucosas del conducto gastrointestinal. Los folículos pilosos también se dividen con frecuencia y son sensibles a algunos medicamentos de quimioterapia. Por este motivo, algunos de estos fármacos producen náuseas, vómito, diarrea y llagas en la boca. Otros dan lugar a una pérdida temporal del cabello; la médula queda temporalmente perjudicada en su función de producir células sanguíneas. Por esto es más fácil que se produzcan infecciones, pues el número de leucocitos es inferior, o que se produzca cansancio o anemia, ya que el número de hematíes también puede disminuir (Cameron *et al.*, 2005).

Ante la situación contraproducente que pueden generar los tratamientos contra el cáncer mencionados anteriormente, ha surgido la búsqueda de nuevas alternativas para tratar esta enfermedad; a las moléculas de origen vegetal entre éstas las moléculas esteroidales, actualmente se les atribuyen actividades biológicas como son antiproliferativas y antitumorales.

Las Saponinas Esteroidales y la Laxogenina-glicosilada

Los esteroides son un conjunto de productos naturales con excepcional importancia química, biológica y médica, poseen un núcleo derivado del ciclopentano-fenantreno constituido por tres anillos de seis miembros y un anillo de cinco miembros, dicho núcleo normalmente se encuentra sustituido por grupos metilo en C-10 y C-13. En C-17 es frecuente encontrar una cadena lateral hidrocarbonada ocasionalmente sustituida. Debido a su diversa acción biológica, varios esteroides de origen natural y sintético son rutinariamente utilizados en medicina (Mann *et al.*, 1994).

Entre las diversas familias que conforman el grupo de los esteroides se encuentran las Saponinas, compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, son metabolitos secundarios biosintéticos cuyos precursores son los esteroides, especialmente el colesterol, los cuales constituyen estructuralmente una clase diversa de productos naturales y son uno de los mejores componentes utilizados en la medicina tradicional. Tienen la capacidad de reducir la tensión superficial de las soluciones acuosas y cuentan con propiedades detergentes (Min-Jie *et al.*, 2005).

Las saponinas son compuestos anfífilos que contienen una parte hidrofílica (un sacárido) y una hidrofóbica (una aglicona triterpénica o esteroidea) (Hostettmann & Marston, 1995). Las saponinas esteroidales se dividen generalmente en tres clases: furostánicas, espirostánicas y colestánicas, las cuales se encuentran biosintéticamente interrelacionadas. Poseen actividad biológica diversa como antimicrobiana, piscicida, molusquicida, insecticida, anticonceptiva, inhibidora del crecimiento vegetal, antiinflamatoria, citotóxica, antitumoral, entre otras. Aunque la aglicona juega el papel

más importante en la actividad biológica, es bien conocido que la composición de los azúcares también tiene relevancia en la actividad de los glicósidos esteroidales; por ejemplo, incrementando la solubilidad de éstos en medio fisiológico, ayudando a la permeabilidad celular y al tiempo de acción, y dirigiendo a la molécula al sitio activo (Yamasaki *et al.*, 1987). En general, reportes indican que la actividad de un esteroide se mejora considerablemente si se encuentra glicosilado y que al eliminar los azúcares de la molécula, ésta disminuye su actividad antitumoral (Pui-Kwong, 2007).

Se ha reportado que en pruebas *in vitro* se manejan como agentes citotóxicos que mejoran la especificidad en el tratamiento del cáncer; y que su actividad está relacionada con la estructura usando una combinación de diferentes azúcares y agliconas (Hong-Ji *et al.*, 2006).

Muchas de las saponinas esteroidales son bastante utilizadas en síntesis para la obtención de compuestos de origen natural. De la hidrólisis enzimática o química de las saponinas se obtienen sapogeninas esteroidales, las cuales poseen 27 átomos de carbono y además del núcleo esteroidal presentan dos anillos más. Existe un aspecto muy importante al definir la estructura de las sapogeninas y es la estereoquímica de los átomos de carbono 5, 22 y 25. En la naturaleza, la mayoría de las sapogeninas poseen la configuración *R* en el carbono espirocetálico C-22, aunque se han llegado a conocer excepciones con la configuración *S* (Tobari *et al.*, 2000). Con respecto a la configuración en C-25, hay dos tipos de sapogeninas: *25R*, en donde el metilo C-27 se encuentra en posición ecuatorial o *25S*, en donde el metilo C-27 se encuentra en posición axial. Es muy importante resaltar la diferencia en la configuración absoluta de C-25, debido a que en muchas transformaciones que involucran modificaciones a la cadena lateral, los rendimientos pueden variar considerablemente debido al efecto estérico del metilo axial C-27. Con respecto a la configuración en C-5, ésta depende de la fusión de los anillos A y B, la cual puede ser *cis* o *trans*, dando lugar a sapogeninas de las series 5α (*trans*) y 5β (*cis*), o puede no existir tal configuración cuando existe un doble enlace (Marker & Krueger, 1940).

El compuesto β -D-glucopiranosido de (25R)-6-oxo-5 α -espirostan-3 β -ilo (laxogenina-glicosilada) [figura 4], es una saponina esteroidal semisintética presente en la naturaleza, fue aislada por Okanishi *et al.*, 1965 y Woo *et al.*, 1992 a partir de *Smilax sieboldi*, un arbusto trepador de la familia de las liliáceas originario de Asia, y más tarde por Okuyama *et al.*, 1995, a partir de *Allium chinense*, éste compuesto pertenece también a la familia de las liliáceas (Baba *et al.*, 2000).

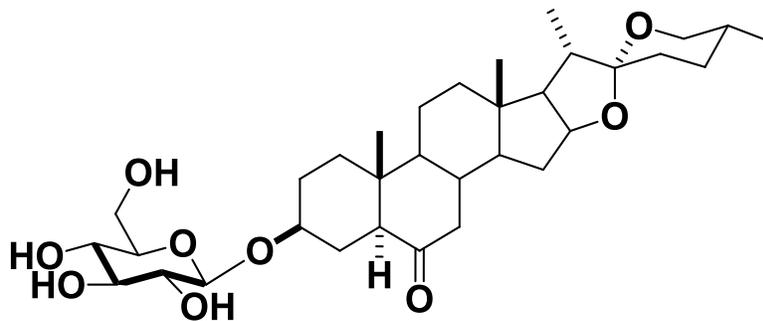


Figura 4. Estructura química de la saponina esteroidal laxogenina-glicosilada, (Fernández *et al.*, 2009).

La laxogenina-glicosilada pertenece al grupo de los triterpenos y se caracteriza por presentar un enlace glicósido en una genina poco polar, con una estructura esteroidal (C27). La importancia de la laxogenina-glicosilada radica en su actividad como promotor del crecimiento vegetal de manera similar a la familia de los brassinoesteroides (Robaina *et al.*, 2006), y en su actividad antiproliferativa (Nishino *et al.*, 1990).

La saponina xiebai es el glicósido más conocido de la laxogenina, sólo se le ha aislado de los bulbos de *Allium chinense* el cual es muy utilizado como especia de cocina en China y Japón, también es una de las principales fuentes de la medicina tradicional “Xiebai” y ha demostrado una potente actividad antiproliferativa en células HeLa (Yu & Tao, 2002).

Planteamiento del Problema

Actualmente el cáncer cérvico-uterino es el segundo tipo de cáncer que se presenta con mayor frecuencia en la población femenina a nivel mundial, y en México se ubica como la segunda causa de muerte en mujeres adultas. Desafortunadamente los tratamientos utilizados para el cáncer, como son, la quimioterapia y la radioterapia son altamente agresivos y muestran poca selectividad que deterioran notablemente la calidad de vida de los pacientes, además son ineficientes en etapas avanzadas de esta enfermedad, por lo que es necesario localizar compuestos de origen vegetal, que presenten las características adecuadas, principalmente antiproliferativos, selectivos e inductores de muerte apoptótica, para así ser utilizados como agentes terapéuticos eficientes. Un ejemplo claro, son cierto número de saponinas esteroides, las cuales han ostentado diversas actividades biológicas así como propiedades antitumorales. La saponina esteroideal laxogenina-glicosilada es un compuesto semisintético que está presente en la naturaleza, y es obtenido mediante una serie de modificaciones químicas a partir de la diosgenina, y de la cual actualmente se tienen pocos datos que describan las propiedades antitumorales de dicho compuesto en líneas de cáncer cérvico-uterino.

Justificación

Hoy en día la incidencia de casos de algún tipo de cáncer aumenta en demasía a nivel mundial. En los últimos años, se ha generado un fuerte interés por conocer las diversas actividades biológicas, entre éstas la actividad antitumoral, de las saponinas esteroidales, así como las de sus derivados y análogos, sin embargo poco se sabe acerca de su actividad biológica sobre cáncer cérvico-uterino, debido a esto, es necesario realizar investigación dirigida hacia la búsqueda de actividad antitumoral de las saponinas esteroidales.

Hipótesis

Es conocido que diferentes saponinas esteroidales presentan actividad antiproliferativa en diferentes líneas tumorales, por lo que se espera que la laxogenina-glicosilada, la cual también es una saponina esteroideal, presente actividad antiproliferativa en líneas tumorales de cáncer cérvico-uterino.

Objetivos

➤ Objetivo general:

Evaluar el efecto antiproliferativo y apoptótico de la β -D-glucopiranosido de (25R)-6-oxo-5 α -espirostan-3 β -ilo (Laxogenina-glicosilada), así como su efecto en el ciclo celular de las líneas celulares de cáncer cérvico-uterino HeLa, CaSki y ViBo, y su efecto selectivo al compararlo con células no tumorales.

➤ Objetivos particulares:

1. Establecer cultivos de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo provenientes de cáncer cérvico-uterino.
2. Determinar la concentración de laxogenina-glicosilada requerida, para disminuir en un 50% el número celular (CI_{50}), en cultivos de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo.
3. Evaluar el efecto de la laxogenina-glicosilada sobre el ciclo celular de las líneas celulares de cáncer cérvico-uterino.
4. Determinar la presencia de cuerpos apoptóticos en las células de cáncer cérvico-uterino después del tratamiento con laxogenina-glicosilada, mediante la tinción nuclear con el fluorocromo DAPI.
5. Determinar mediante inmunocitoquímica si la laxogenina-glicosilada induce la expresión de caspasa 3 activa, como parámetro de inducción de muerte por apoptosis.
6. Determinar si la laxogenina-glicosilada induce fragmentación de ADN en las células tumorales como un parámetro de muerte por apoptosis, a través de la técnica de TUNEL.
7. Evaluar el efecto antiproliferativo de la laxogenina-glicosilada en células linfocíticas humanas no tumorales.

Material y Métodos

➤ Preparación del stock del compuesto.

La saponina β -D-glucopiranosido de (25R)-6-oxo-5 α -espirostan-3 β -ilo (laxogenina-glicosilada) fue sintetizada en el laboratorio de síntesis química de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (Fernández *et al.*, 2009), por el grupo de investigadores dirigido por el Dr. Jesús Sandoval Ramírez.

El stock del compuesto se preparó a una concentración de 1000 μ g de Laxogenina-glicosilada en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO).

➤ Cultivo de las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo.

Con las líneas celulares de carcinoma epidermoide de cuello uterino: HeLa positivo al VPH tipo 18, CaSki positivo al VPH tipo 16 y ViBo negativo a VPH, se establecieron cultivos celulares en cajas Petri de 100 mm de diámetro, con 10 mL de medio de cultivo RPMI-1640 (1640 del Roswell Park Memorial Institute; GIBCO, USA) con rojo fenol, suplementado con L-glutamina, bencilpenicilina (Grünenthal, MEX) y NSC (suero de neonato de ternera; GIBCO, USA) al 5%, desactivado previamente a 56°C durante 30 minutos. Los cultivos se mantuvieron incubados a 5% de CO₂ y a una temperatura de 37°C. Posteriormente, se sembraron en cajas de 96 pozos (7500 células/pozo) bajo las mismas condiciones, luego de estimular las células con laxogenina-glicosilada partiendo de una concentración de 0.78 μ g/mL a 100 μ g/mL (tomado del stock), se obtuvo una gráfica dosis respuesta que generó los intervalos para calcular la CI₅₀, y así determinar la concentración adecuada de laxogenina-glicosilada para disminuir en un 50% la proliferación celular en las diversas líneas tumorales de CaCU (cáncer cérvico-uterino), y al cabo de 24 horas las placas de cultivo fueron evaluadas por el método de incorporación de cristal violeta.

- Determinación de la proliferación celular mediante la técnica de incorporación del colorante cristal violeta.

La técnica para evaluar la proliferación celular consistió en sembrar y estimular a las células en las mismas condiciones del cultivo mencionadas anteriormente, transcurrido el tiempo de estímulo (24 horas), las células se fijaron durante 10 minutos con glutaraldehído al 1.1% (SIGMA-Aldric, USA); posteriormente las placas fueron lavadas y secadas al aire. Se añadieron 50 µL/ pozo del colorante cristal violeta al 0.1% en solución amortiguadora de ácido fórmico (SIGMA-Aldric, USA) pH 6.0 y se mantuvieron durante 10 minutos en agitación constante. Después de la tinción, las cajas de cultivo fueron lavadas tres veces con agua desionizada o bidestilada de tal manera que el colorante no asimilado fue retirado de los pozos. Posteriormente se añadieron 50 µL de ácido acético al 10% y se dejaron en agitación durante 20 minutos a temperatura ambiente, esto para desteñir las células y procurar que el colorante quedara en suspensión de forma homogénea. Finalmente se tomó lectura de cada pozo en un lector de placas de ELISA (Elx800; Bio-Tek) a 590 nm, y las densidades ópticas se graficaron como porcentaje de proliferación celular con respecto al control.

- Efecto de la laxogenina-glicosilada en el ciclo celular.

Se sembraron 1, 000,000 de células de las líneas celulares CaSki, HeLa y ViBo en cajas de cultivo de 50 mm de plástico (Corning inc. USA), para los tratamientos se contemplaron las CI_{50} del compuesto esteroidal laxogenina-glicosilada. Para la evaluación por citometría de flujo, las células HeLa y CaSki fueron despegadas de las cajas de cultivo con Verseno mientras que las células ViBo con Tripsina, luego fueron centrifugadas y lavadas con solución buffer de fosfatos (PBS) pH 7.3. El botón celular se fijó y resuspendió con 1mL de metanol al 50% en PBS, luego de 20 minutos fueron centrifugadas y lavadas con PBS. El botón celular fue resuspendido con 500 µL de ARNasa (2.5 U/mL) e incubado a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se adicionaron 10 µL de yoduro de propidio (0.2 µg/mL), se mezcló y protegió de la luz.

Finalmente se analizaron las muestras en el citómetro de flujo (FACS Aria II, BD systems EUA) con el programa BDFacs Diva.

Nota: se realizaron 6 ensayos por cada línea celular de CaCU.

➤ Determinación de la expresión de caspasa 3 activa.

Para determinar si la saponina esteroideal laxogenina-glicosilada induce un incremento en la concentración de caspasa 3 activa, como parámetro para inducir apoptosis, 250, 000 células fueron sembradas en cubreobjetos de 1x1 cm en un volumen de 2.5 mL de RPMI-1640 al 5 % de NCS en cámara húmeda durante 24 horas. La técnica consistió en tratar a las líneas celulares de CaCU con las CI_{50} de laxogenina-glicosilada correspondientes. Para realizar la detección de la caspasa-3 activa en ensayos por inmunocitoquímica, primeramente las células se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 15 minutos, al término de el tiempo se procedió a lavar cuidadosamente 3 veces con PBS, posteriormente se permeó con tritón X-100 al 0.5% (GIBCO, USA) durante 5 minutos a 4°C, y nuevamente las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS, en seguida se realizó un bloqueo con PBS-BSA Tween 20 (Albumina Sérica de Bovina) durante una hora, después se adicionó el anticuerpo primario para caspasa-3 activa (Anti-caspase 3 active antibody produced in Rabbit 1:50 en PBS; SIGMA-Aldrich,. USA) y se incubó durante 24 horas a 4 °C, al término del tiempo, las muestras fueron lavadas con PBS y se aplicó el anticuerpo secundario con fluorocromo (goat anti-rabbit con FITC 1:200 en PBS. Neomarker Fremont, USA) en cámara húmeda y en oscuridad durante 2 horas, posteriormente se lavaron las muestras 3 veces con PBS, se les aplicó el fluorocromo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, SIGMA-Aldrich, USA), y se incubaron durante 1 minuto e inmediatamente se lavaron 3 veces con PBS, y finalmente se realizó el montaje de las muestras en un portaobjetos con medio de montaje VECTASHIELD Mounting Medium (VECTOR LABORATORIES, USA). Finalmente las preparaciones fueron observadas y fotografiadas por un microscopio de epifluorescencia (Nikon, JAP), en las cuales la coloración verde indicó la presencia de caspasa 3 activa.

Nota: se realizaron 3 ensayos por cada línea celular de CaCU.

- Detección específica de los extremos 3'OH de fragmentos de cadenas de ADN (TUNEL).

Para determinar si el efecto antiproliferativo de la laxogenina-glicosilada induce fragmentación del ADN como un parámetro de muerte apoptótica, se desarrolló la técnica de marcaje *in situ* denominada TUNEL (Transfer Uridin Nick-End Labelling), Gavrieli *et al.*, 1992. La cual consiste en la incorporación de nucleótidos marcados con rodamina en los grupos hidroxilos (3'OH) terminales que han quedado expuestos durante el proceso de fragmentación de la doble cadena de ADN por activación de la endonucleasa endógena. Los nucleótidos biotinilados, son incorporados por la enzima TDT al extremo 3'OH del DNA fragmentado. Los núcleos positivos al marcaje TUNEL se observan con una fluorescencia roja. Esta fragmentación del ADN fue determinada mediante el kit Apoptag Red *in situ* apoptosis detection Kit (Chemicals, USA). Primeramente 250, 000 células fueron sembradas en cubreobjetos de 1x1 cm en un volumen de 2.5 mL de RPMI-1640 al 5 % de NCS en cámara húmeda a 37°C durante 24 horas. Posteriormente las células se fijaron con paraformaldehído al 2% en PBS durante 20 minutos. Luego se lavaron con PBS 3 veces, y después se permearon con tritón X-100 al 0.5% en PBS a 4°C durante 5 minutos y se lavaron 3 veces con PBS, de inmediato se añadió buffer de equilibrio en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 15 minutos y se retiró el exceso con papel, de inmediato se incubaron con la enzima Tdt más el buffer de reacción en cámara húmeda durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se detuvo la reacción con buffer de paro diluido en H₂O bidestilada, y se pusieron en agitación suave durante 10 minutos, al termino de este tiempo se lavaron tres veces con PBS. Luego se incubaron con anti-digoxigenina mas la solución de bloqueo en oscuridad y a temperatura ambiente durante 45 minutos, y después fueron lavadas con PBS tres veces en cámara húmeda. Se incubaron con DAPI durante 1 minuto y se les realizaron tres lavados. Finalmente las preparaciones fueron montadas en un portaobjetos con medio de montaje VECTASHIELD Mounting Medium (VECTOR LABORATORIES, USA), y se mantuvieron en oscuridad a -20°C hasta ser observadas en un microscopio de epifluorescencia (Nikon, JAP).

Nota: se realizaron 3 ensayos por cada línea celular de CaCU.

➤ Determinación de necrosis por medio de la liberación de LDH.

En placas de 96 pozos (Corning, USA), se sembraron 7, 500 células por pozo de las líneas HeLa, CaSki y ViBo con 100 μ L de medio RPMI al 5% durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se retiró el medio de cultivo y se agregaron las CI_{50} correspondientes. Fueron considerados, un control positivo y un control basal o negativo a los cuales sólo les fue cambiado el medio de cultivo por medio fresco y un control que contempló la cantidad de DMSO máxima utilizada para solubilizar el compuesto, y una muestra por cada una de las CI_{50} . Se efectuó el tratamiento con la CI_{50} para cada una de las líneas celulares. Una hora antes de cumplir las 24 horas de estímulo, se agregó tritón X-100 al 1 % al control positivo. Cumplidas las 24 horas se retiró el medio de cultivo de cada uno de los pozos en tubos cónicos de plástico de 600 μ L y se centrifugó a 2,000 rpm. El medio fue colocado en una placa de 96 pozos, 100 μ L por pozo, y se le agregaron 100 μ L de mezcla de reacción del Kit de evaluación de citotoxicidad por LDH (Colorante 11.25 ml más catalizador 250 μ L Bio-Vision). Se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, y finalmente el ensayo se evaluó en un lector de placas a 490 nm.

➤ Cultivo de linfocitos humanos.

Para realizar el cultivo de linfocitos humanos, primeramente se colectaron 20 mL de sangre periférica de un humano sano en tubos con EDTA, posteriormente la sangre fue vertida en cuatro tubos cónicos de vidrio, los cuales ya contenían 5 mL de histopaque (Sigma-Aldrich, USA), y en seguida fueron centrifugados, inicialmente a una velocidad de 300 rpm y la velocidad se incrementó gradualmente de (300 rpm más cada 2 minutos) hasta llegar a 1500 rpm, se dejaron centrifugar durante 25 minutos más. En seguida se retiró el plasma sanguíneo y se colectó el anillo de leucocitos, el paquete celular obtenido de cada tubo fue transferido a tubos limpios y resuspendido con 10 mL de PBS cada uno, a continuación se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante para resuspenderse en 1 ml de medio de cultivo (RPMI-1640) suplementado con 10% de NSC (suero de neonato de ternera; GIBCO,

USA). Las células obtenidas se sembraron en cajas Petri de 100 mm, en 10 mL de RPMI-1640 suplementado con 20% de SFB y se incubaron durante 1h. Transcurrido el tiempo, se colectaron todas las células en suspensión en un tubo cónico de vidrio. Una vez centrifugada la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 5 mL de RPMI-1640 sin suero y finalmente se determinó el número celular mediante una cámara de Neubauer.

- Evaluación del efecto de la laxogenina-glicosilada sobre la proliferación de linfocitos humanos mediante la técnica de incorporación de carboxifluoresceína (CSFE).

Para el ensayo de Carboxifluoresceína, inicialmente se agregaron en tubos cónicos de 2 mL la concentración de laxogenina-glicosilada correspondiente a la CI_{50} más alta para las tres líneas celulares de CaCU a evaluar, cuidando mantener la concentración final de 1, 000,000 de células por mililitro de medio total. Para marcar con Carboxifluoresceína (SIGMA-Aldrich, USA) los linfocitos se resuspendieron en PBS con Carboxifluoresceína (2 μ M) y se incubaron por 15 minutos protegidos de la luz y a temperatura ambiente. Posteriormente las células fueron lavadas dos veces con PBS al 5% de SFB, luego se centrifugaron a 1500 rpm y se resuspendieron en RPMI-1640 al 20% de SFB. Para activarlos con FGH (fitohemaglutinina), los linfocitos fueron transferidos a tubos cónicos de 2 ml a una densidad de 1, 000, 000 de células por mililitro de RPMI-1640 suplementado con 20% de SFB y 25 μ L de fitohemaglutinina (Micro Lab S.A., MEX).

Para el ensayo se obtuvieron, un grupo de linfocitos sin activar, un grupo de linfocitos activados sin tratamiento y tres grupos de linfocitos activados tratados con las CI_{50} de laxogenina-glicosilada, en RPMI al 20% de SFB. Las células contenidas en cada tubo se sembraron en una la placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 200, 000 células por cada pozo a un volumen de 200 μ L, incubándose durante 72 horas. Transcurrido el tiempo, las células fueron cosechadas y resuspendidas en 1 mL de

verseno a 4°C durante 3 minutos, se retiró el verseno, y se lavaron dos veces con 500 µL de PBS, posteriormente se resuspendieron en 500 µl de paraformaldehído al 1%. Finalmente se leyeron en el citómetro de flujo (FACS Aria II, BD systems USA) y se analizaron con el programa BDFacs Diva.

- Determinación de muerte celular por necrosis a través de la liberación de la enzima LDH en cultivos de linfocitos humanos no tumorales.

Las células se sembraron en una caja Petri de 100 mm (Pirex, USA) a un volumen total de 10 mL de RPMI-1640 suplementado con 20 % de SFB, y se incubaron durante 1h en condiciones de cultivo. Transcurrido el tiempo, se cosecharon todas las células que permanecían en suspensión, en un tubo cónico de vidrio. Se centrifugó la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos, y se retiró el sobrenadante, se resuspendió nuevamente el botón celular en 5 mL de RPMI-1640 sin suero. Se tomó una alícuota de 20 µL, y se determinó el número celular mediante una cámara de Neubauer. Los linfocitos fueron transferidos a tubos cónicos de plástico de 1.6 mL a una densidad de 10^6 células/mL de RPMI-1640 al 20% de SFB y 25 µL de FGH (fitohemaglutinina) por mL (Micro Lab S.A., Méx.). La preparación de los tratamientos se realizó de la siguiente manera: un control células solo con medio de cultivo y células con y sin FGH, un control positivo al cual se le agregó tritón X-100, un tratamiento control para el vehículo, al cual se le agregó la cantidad de DMSO empleada en la preparación de la CI_{50} más alta obtenida para células tumorales de CaCU, y un tratamiento de laxogenina-glicosilada por cada CI_{50} . Las células contenidas en cada tubo cónico fueron sembradas en una placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 200,000 células/pozo en un volumen de 200 µL y fueron incubadas en condiciones de cultivo por 72 h. Para la evaluación, a las 71 h de tratamiento al control positivo se agregaron 2 µL de tritón X-100, se homogenizó piteando suavemente el medio de cultivo y se incubó durante 1 h más. A las 72 h de cultivo las células fueron cosechadas extrayendo todo el medio de cultivo, y colectando en tubos cónicos de plástico de 0.6 ml de manera individual. Se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, y se traspasaron 50 µL de cada muestra y de cada tratamiento a una placa de 96 pozos para su evaluación.

La actividad de LDH se determinó con el kit Cyto Tox 96 (Promega, USA), del cual se agregaron 50 μ L de la mezcla de reacción. Se incubó a temperatura ambiente protegiendo de la luz por 30 minutos. Finalmente se evaluó a una longitud de onda de 490 nm en un espectrofotómetro lector de placas de ELISA (Image Tecan Spectra), y los datos se analizaron haciendo una comparación relativa al control positivo tratado con tritón X-100.

Nota: Todas las muestras se realizan por triplicado.

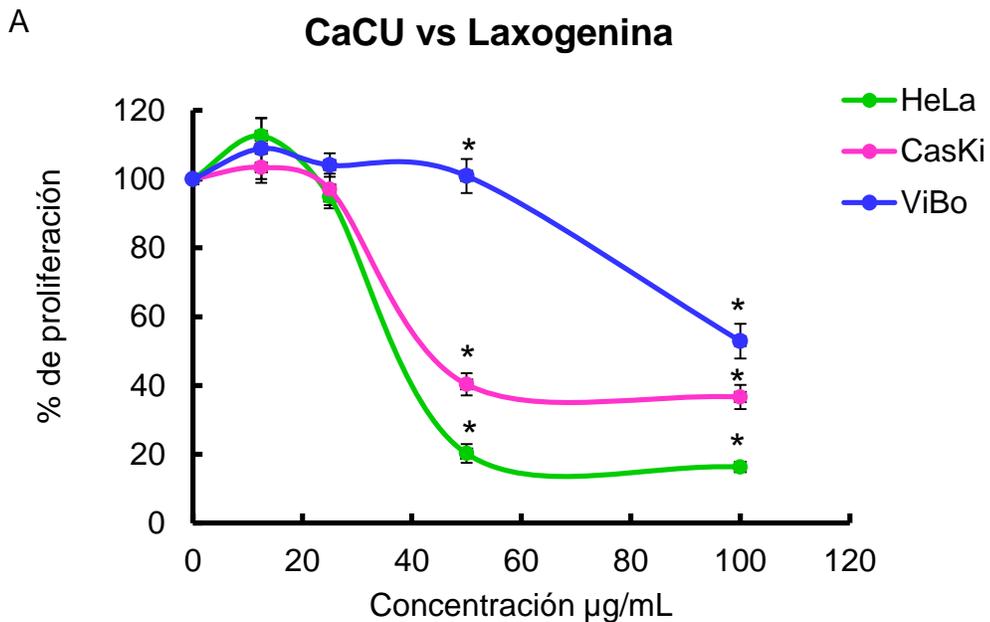
➤ Análisis Estadístico.

Los resultados obtenidos se muestran como la media de 3 experimentos independientes, con al menos 6 repeticiones. A los que se les realizaron análisis de varianza (ANOVA) para la comparación entre medias, se utilizó el programa SPSS 14.0 para Windows 7 seguida de una prueba de Tukey para determinar la diferencia entre pares de medias con un nivel de significancia de 0.05.

Resultados

Efecto antiproliferativo (CI₅₀).

Es conocido que la laxogenina-glicosilada afecta el potencial proliferativo de las líneas tumorales de CaCU HeLa, CaSki y ViBo de manera dosis dependiente (Fernández *et al.*, 2009). Con el propósito de evaluar si la laxogenina-glicosilada afecta el potencial proliferativo en las líneas tumorales de CaCU HeLa, CaSki y ViBo, cultivos de éstas tres líneas fueron estimuladas de manera independiente con diferentes concentraciones de la saponina esteroidal, y las concentraciones que inhiben la densidad celular en un 50% fueron calculadas (CI₅₀), [Figura 5 A y B].



B

CaCU vs Laxogenina

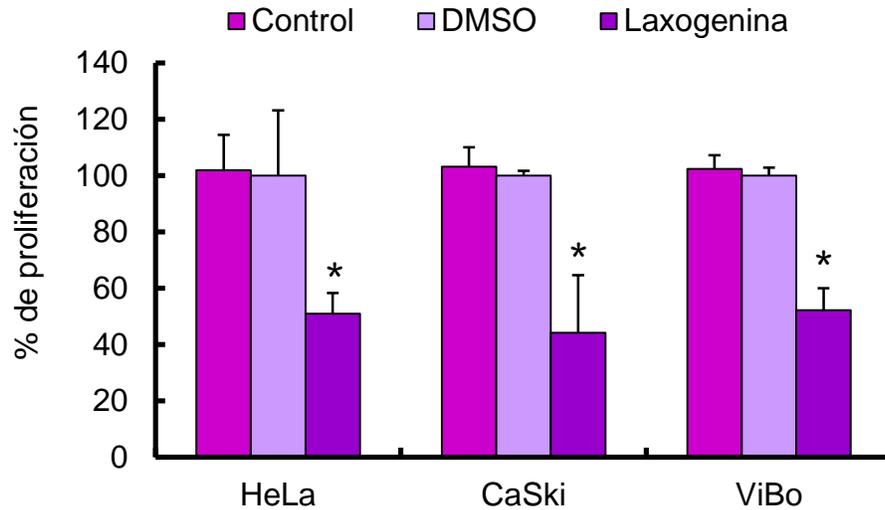


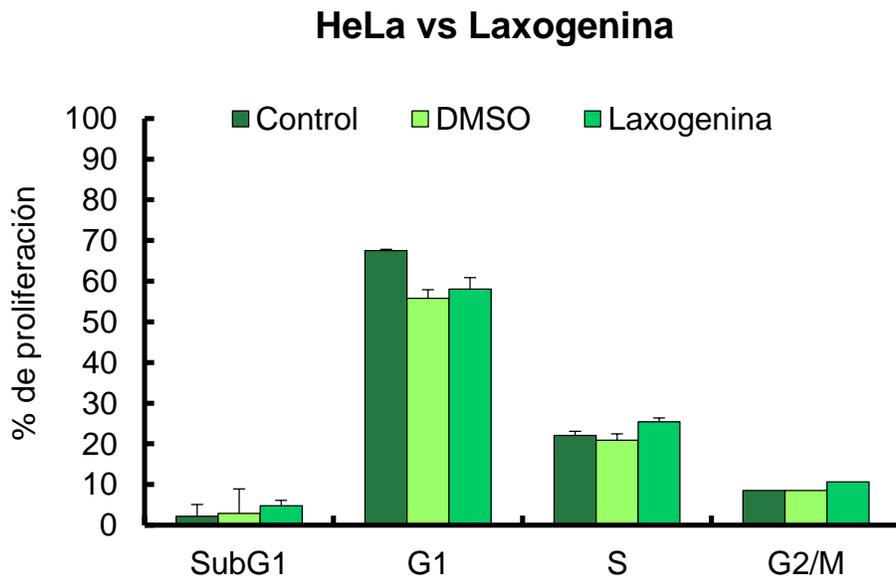
Figura 5 A y B. Efecto antiproliferativo de la laxogenina-glicosilada en las líneas tumorales de CaCU HeLa, CaSki y ViBo creciendo en RPMI al 5% de NSC. A: Curva dosis respuesta de células HeLa, CaSki y ViBo tratadas a las concentraciones de 12.5, 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de laxogenina-glicosilada respectivamente. B: Control, cultivo de células HeLa, CaSki y ViBo sin tratamiento; DMSO, tratadas con dimetilsulfóxido al 1%; Laxogenina-glicosilada, cultivos estimulados con 57, 71 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. * Indican que estadísticamente existe diferencia significativa entre los valores obtenidos.

Los resultados obtenidos muestran que la laxogenina-glicosilada ejerce un efecto dosis dependiente en las tres líneas tumorales, es decir, conforme se incrementa la concentración del compuesto el número celular disminuye, [Figura 5-A]. De igual manera, las CI_{50s} de las líneas de CaCU HeLa, CaSki y ViBo fueron calculadas utilizando la ecuación de la línea recta obteniendo valores de 57, 71 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente, [Figura 5-B].

Efecto en el ciclo celular.

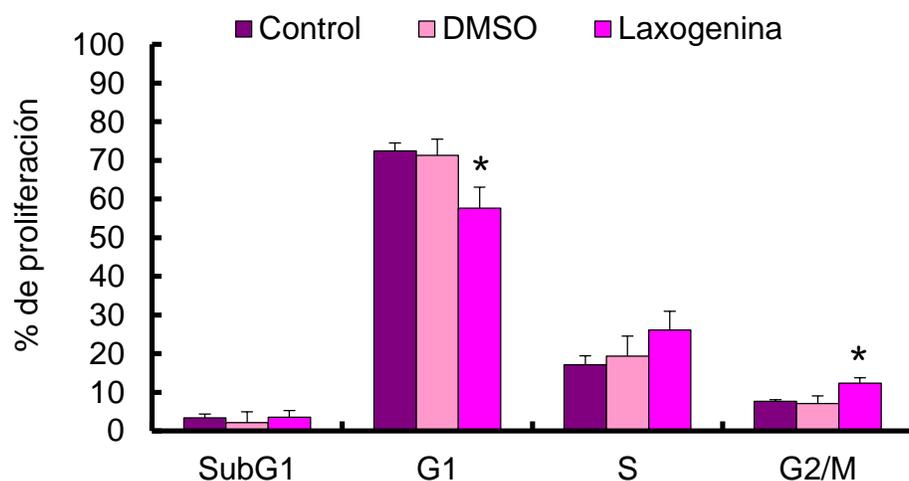
Una vez determinado que el esteroide laxogenina-glicosilada presenta actividad antiproliferativa en células de CaCU, y el hecho de que algunos compuestos que son utilizados en el tratamiento contra el cáncer, afectan a células que se encuentran ciclando, deteniéndolas en alguna fase del ciclo celular (generalmente la fase G1), (Mandal *et al.*, 2007), se procedió a determinar si el decremento observado en el número celular está relacionado con el ciclo celular. Para ello cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron estimulados con la concentración de CI_{50} de laxogenina-glicosilada obtenidas para cada línea, y se determinó la distribución de ADN en las distintas fases del ciclo celular por citometría de flujo [Figura 6 A, B y C].

A



B

CaSki vs Laxogenina



C

ViBo vs Laxogenina

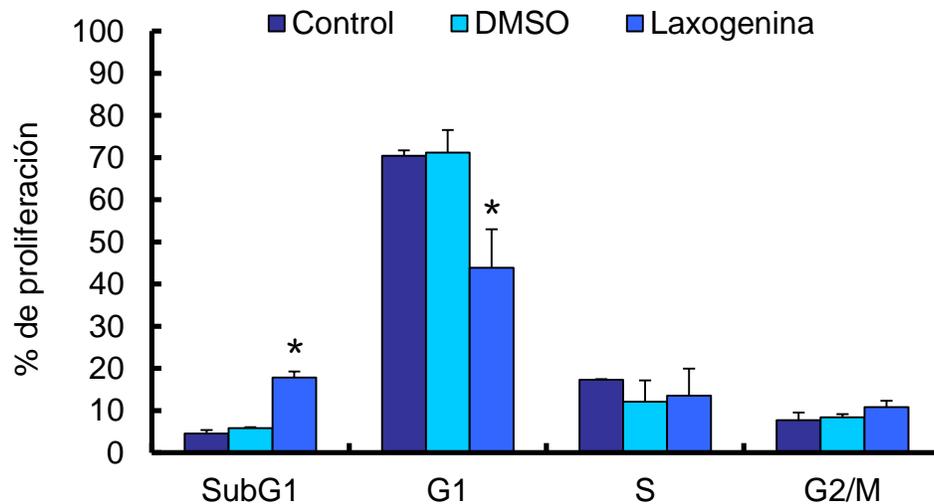


Figura 6 A, B y C. Efecto de la laxogenina-glicosilada en el ciclo celular de células de CaCU. A: Cultivos de células HeLa tratadas con y sin laxogenina-glicosilada (57 $\mu\text{g}/\text{mL}$); B: Cultivos de células CaSki tratadas con y sin laxogenina-glicosilada (71 $\mu\text{g}/\text{mL}$); C: Cultivos de células ViBo tratadas con y sin laxogenina-glicosilada (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). * Indican que estadísticamente existe diferencia significativa entre los valores obtenidos.

Como se puede observar en la figura 6, la laxogenina-glicosilada solamente afectó el ciclo celular de las células CaSki y ViBo, disminuyendo en CaSki el número de células que se encuentran en la fase G1 e incrementando el número de células que se encuentran en la fase G2/M, mientras que en ViBo disminuyó el número celular en la fase G1 e incrementó el número celular en Sub G1, indicando que la actividad antiproliferativa de la laxogenina-glicosilada puede ser dependiente o independiente del ciclo, según sea la línea celular a tratar. Debido a que los porcentajes obtenidos de cada fase del ciclo de las células HeLa tratadas con la laxogenina-glicosilada no presentan diferencia estadísticamente significativa, se establece que el decremento observado en el número celular es ocasionado por una acción diferente al ciclo celular, por lo que es necesario determinar si este decremento es causado por una acción citotóxica o por la inducción de una muerte celular programada como la apoptosis. Por otro lado, el hecho de mostrar que la laxogenina-glicosilada presenta actividad antiproliferativa dependiente o independiente del ciclo celular en líneas tumorales de cáncer cérvico-uterino, genera la necesidad de establecer si ésta saponina esteroideal afecta el potencial proliferativo de células no tumorales.

Actividad antiproliferativa en células linfocíticas humanas no tumorales.

Con la intención de establecer si la laxogenina-glicosilada afecta el potencial proliferativo de células no tumorales, cultivos de células linfocíticas humanas fueron marcados con carboxifluoresceína (CFSE) y tratados con 57, 71 y 100 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente durante 72 h y el porcentaje de proliferación celular fue determinado por citometría de flujo [Figura 7].

Proliferación de Linfocitos

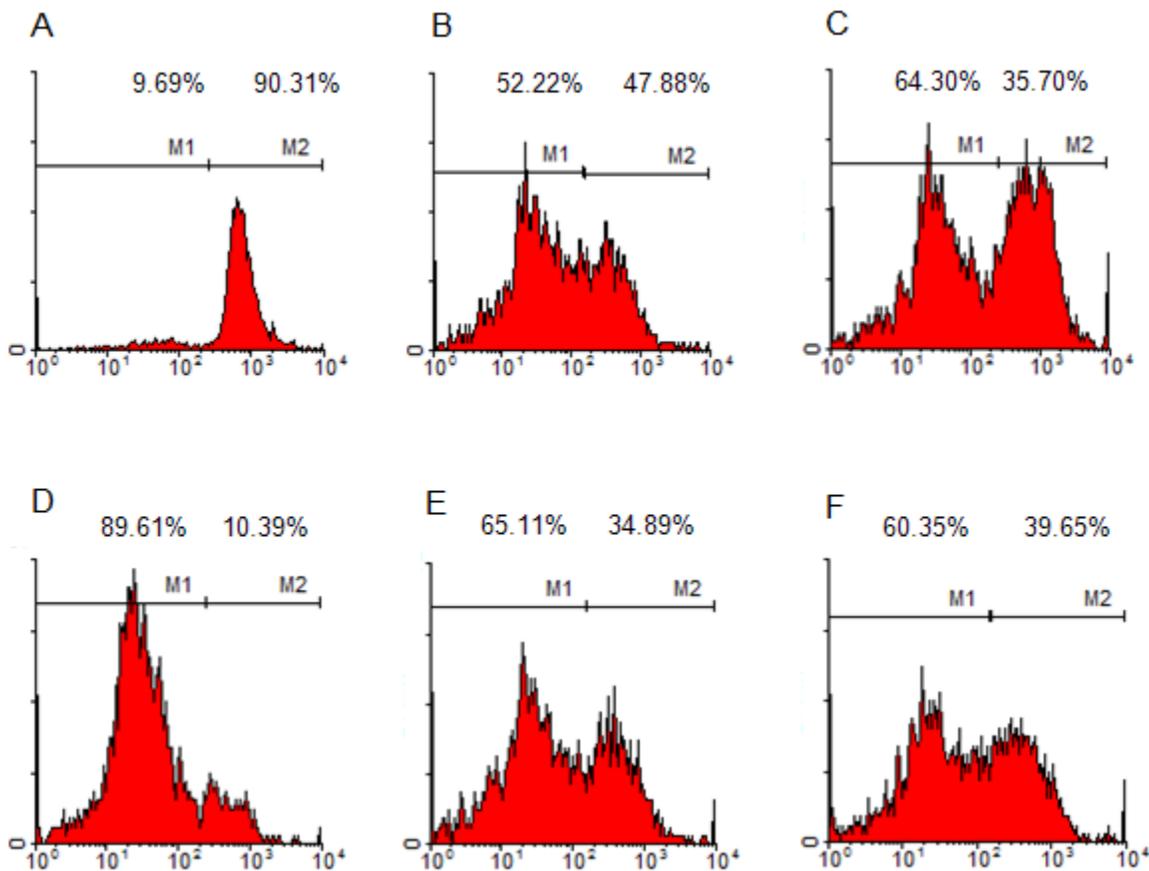


Figura 7 A-F. Efecto de la saponina laxogenina-glicosilada en el potencial proliferativo de linfocitos humanos no tumorales. A: cultivo de linfocitos sin activar. B: linfocitos activados con fitohemaglutinina (PHA). C: linfocitos tratados con DMSO. D: linfocitos tratados con 57 $\mu\text{g/mL}$ de laxogenina-glicosilada. E: linfocitos tratados con 71 $\mu\text{g/mL}$ de laxogenina-glicosilada. F: linfocitos tratados con 100 $\mu\text{g/mL}$ de laxogenina-glicosilada. Linfocitos evaluados a las 72 h mediante la técnica de la incorporación de CFSE. La figura es representativa de por lo menos tres ensayos independientes.

Los resultados mostrados en la figura 7 establecen que la laxogenina-glicosilada no afecta el potencial proliferativo de las células linfocíticas de manera negativa, indicando una actividad antiproliferativa de acción selectiva. Sin embargo, a la concentración más baja del esteroide, la proliferación de las células linfocíticas fue incrementada 1.39 veces aproximadamente comparado con el vehículo, sugiriendo que la laxogenina-glicosilada podría ejercer una actividad inmunoestimuladora.

Inducción de necrosis en células tumorales.

El hecho de observar un decremento en el número celular en los cultivos de células tumorales de CaCU tratadas con la laxogenina-glicosilada, así como el de observar un nulo o pequeño efecto en el ciclo celular que indica que este decremento es causado por un evento diferente a la detención del ciclo celular, abre la posibilidad de que dicho decremento sea consecuencia de la inducción de una muerte celular. Al respecto y con el propósito de evaluar si el fitoesteroide laxogenina-glicosilada induce una muerte necrótica en las células tumorales, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con el esteroide laxogenina-glicosilada durante 24 h y la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) fue evaluada en los sobrenadantes como un marcador de necrosis [Figura 8].

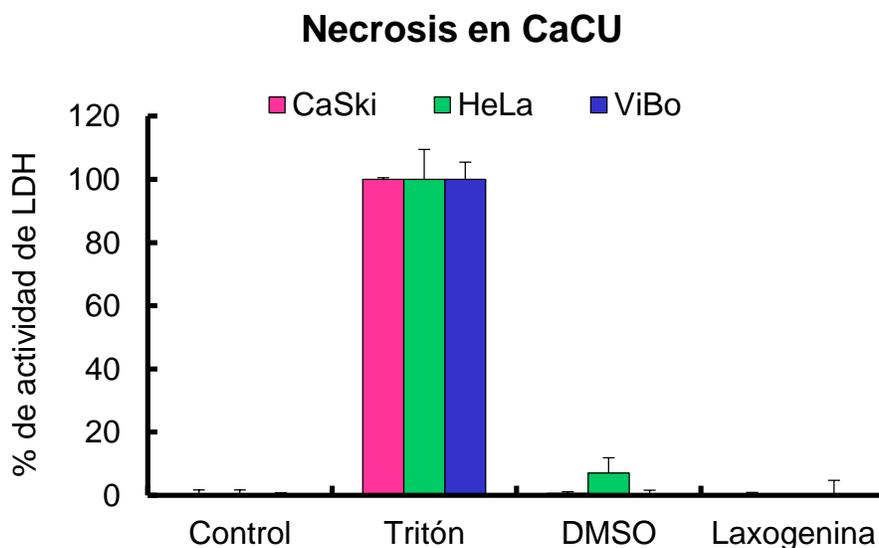


Figura 8. Determinación de la actividad de la LDH en sobrenadantes provenientes de cultivos celulares de las líneas HeLa, CaSki y ViBo estimuladas con las CI_{50} respectivas de laxogenina-glicosilada.

La nula detección de LDH en los sobrenadantes de los cultivos de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo tratados con la laxogenina-glicosilada, establecen que esta saponina no induce muerte necrótica en éstas líneas tumorales y por lo tanto el decremento en el número celular es causado por una muerte diferente a la muerte por necrosis. No obstante éstos resultados, es importante determinar si la laxogenina-glicosilada induce necrosis en células no tumorales.

Inducción de necrosis en células linfocíticas humana no tumorales.

Con el propósito de evaluar si el fitoesteroide laxogenina-glicosilada induce una muerte necrótica en células no tumorales, cultivos de células linfocíticas fueron tratadas con el esteroide laxogenina-glicosilada durante 72 h y la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) fue evaluada en los sobrenadantes como un marcador de necrosis [Figura 9].

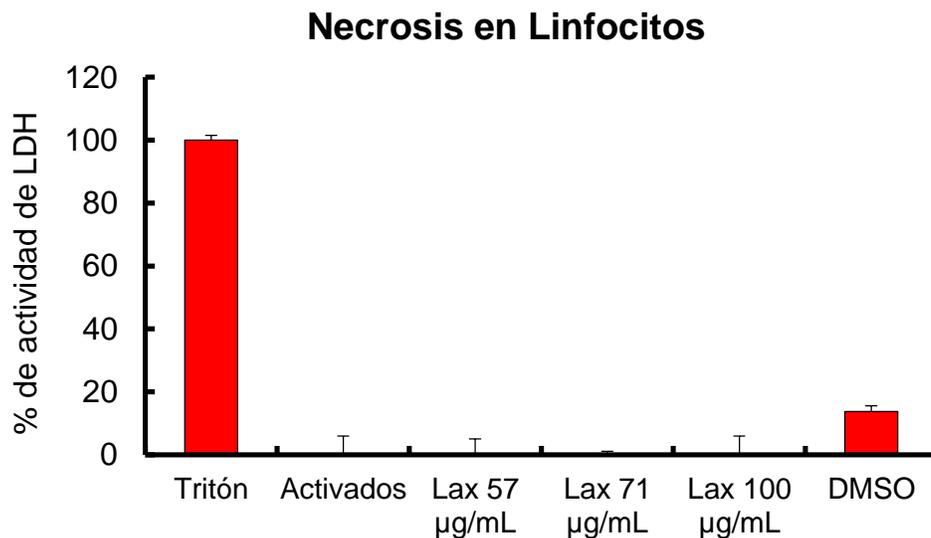


Figura 9. Determinación de la actividad de la LDH en sobrenadantes provenientes de cultivos celulares CaSki, HeLa y ViBo estimulados con las respectivas Cl_{50} de la saponina laxogenina-glicosilada.

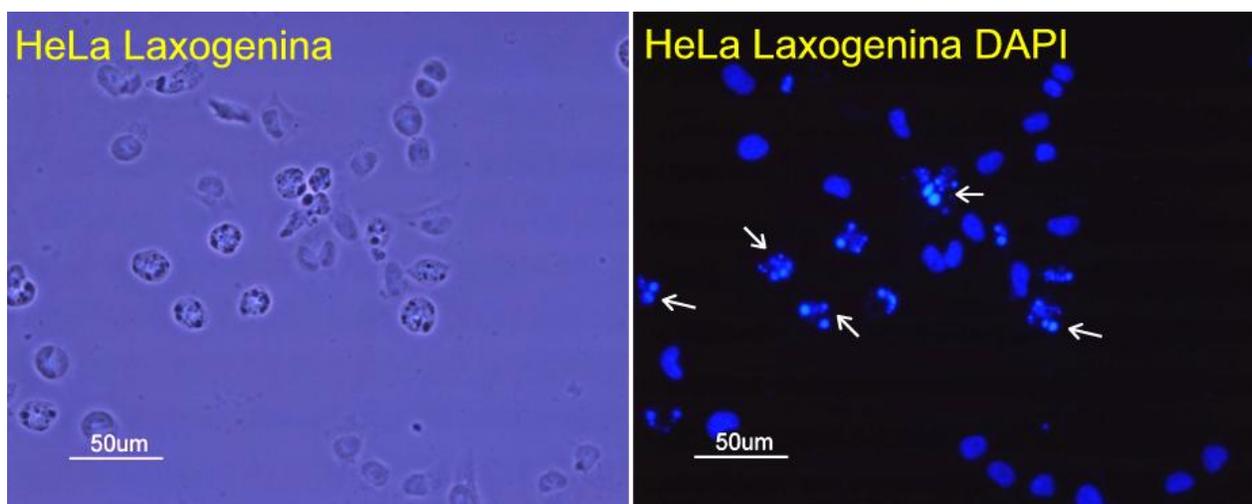
Como se puede observar en la figura 9, y al igual que en las células tumorales de CaCU [Figura 8], no se detectó LDH en los sobrenadantes provenientes de los cultivos de células linfocíticas, sugiriendo que la laxogenina-glicosilada no induce a una muerte

necrótica ni en células tumorales ni en células no tumorales y el decremento en el número celular observado en las células tumorales es generado por una muerte diferente a la necrosis. Otro tipo de muerte celular muy conocida es la muerte celular programada, la cual es una muerte celular natural que se presenta en células normales, cuyo propósito es eliminar a las células senescentes o disfuncionales. Ésta se caracteriza por inducir condensación de la cromatina, contracción celular, formación de cuerpos apoptóticos, activación de caspasas y fragmentación del ADN. Se ha descrito que algunos fitoesteroides como la dioscina, la hecogenina entre otras, inducen la muerte por apoptosis, por lo que es importante determinar si esta sapogenina es capaz de inducir muerte por apoptosis en las células tumorales. Al respecto, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con el esteroide laxogenina-glicosilada y la contracción celular y la formación de cuerpos apoptóticos fue determinada tiñendo los núcleos con el fluorocromo DAPI y observados a través de un microscopio de epifluorescencia, como dos características de apoptosis [Figura 10 A, B y C].

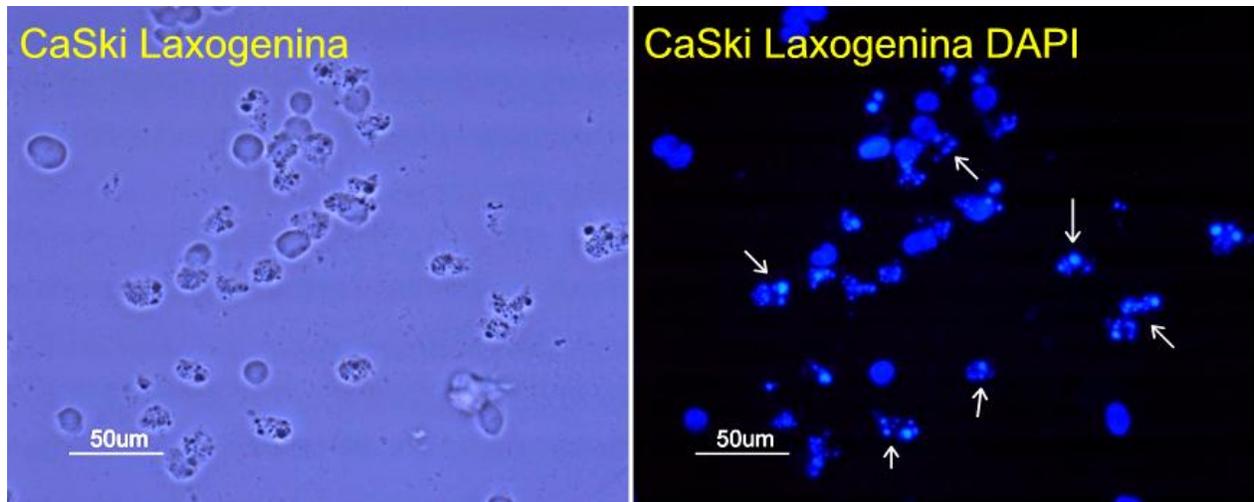
Efecto apoptótico en células tumorales.

Figura 10 A, B y C.

A



B



C

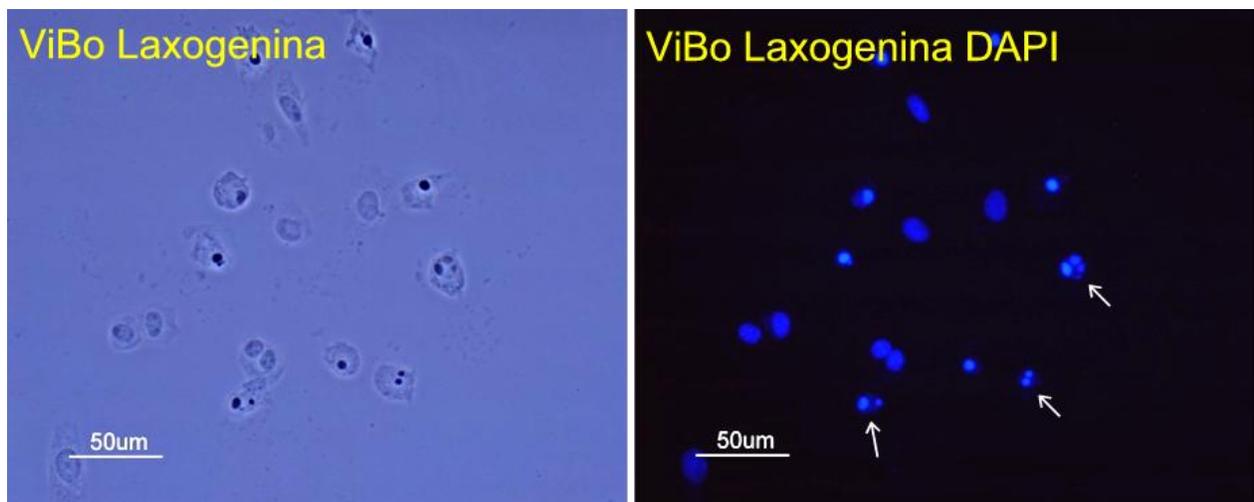


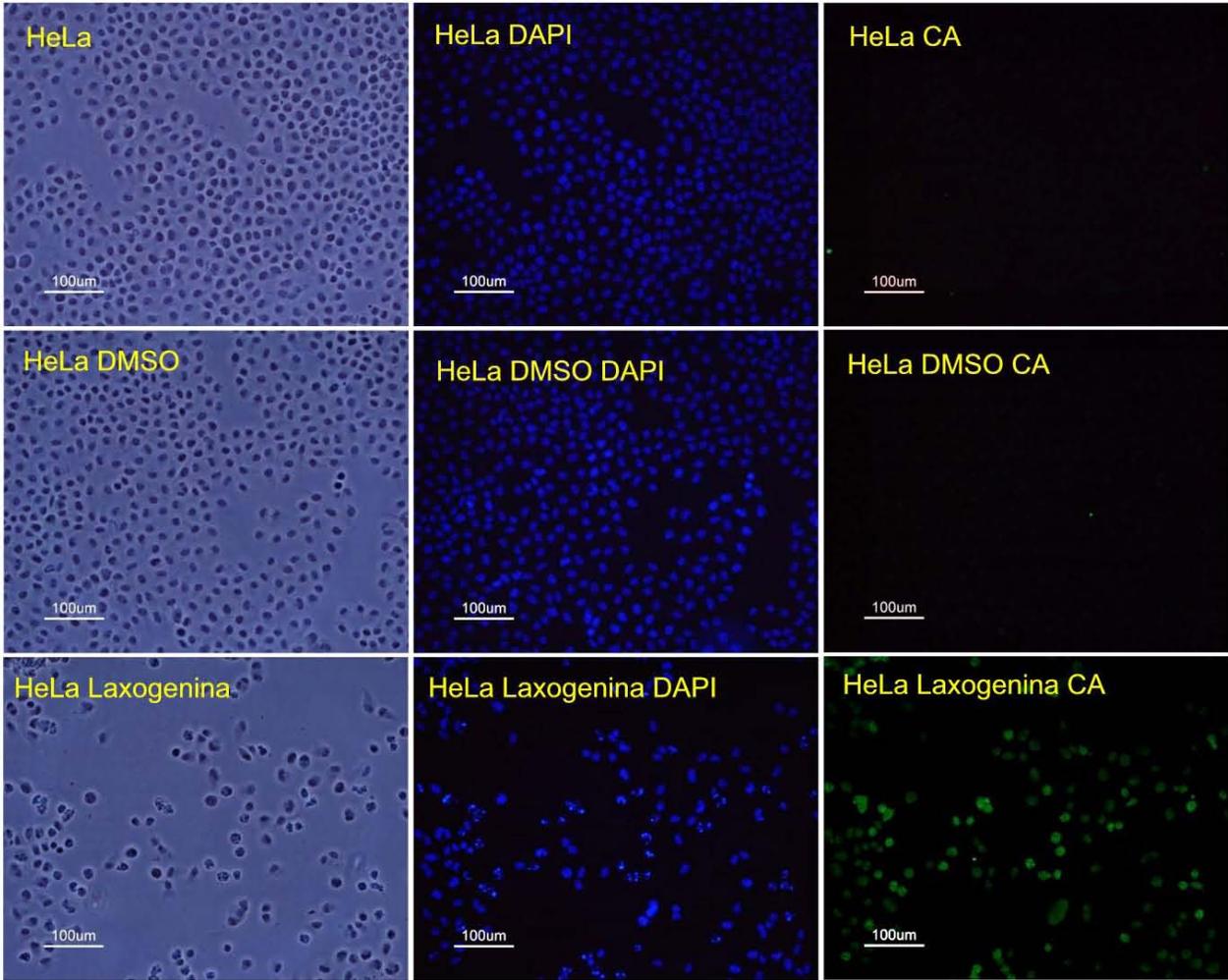
Figura 10 A, B Y C. Inducción de contracción celular y formación de cuerpos apoptóticos en cultivos de células tumorales HeLa, CaSki y ViBo tratadas con laxogenina-glicosilada. 250,000 células fueron sembradas en cubreobjetos de 1x1 cm², con 2.5 mL de RPMI-1640 al 5% de NCS y tratadas con la respectiva CI₅₀ de laxogenina-glicosilada durante 24 h.

Como se muestra en la figura 10 A, B y C, la laxogenina-glicosilada indujo a las células a presentar un menor tamaño, mostrando un citoplasma reducido, mientras que los núcleos teñidos con DAPI en estas mismas células mostraron la formación de cuerpos apoptóticos, sugiriendo que el esteroide laxogenina-glicosilada induce a las células tumorales a una muerte por apoptosis. Pese a los resultados obtenidos, es necesario determinar si el proceso apoptótico es llevado a cabo hasta su término, por lo que es necesario evaluar la activación de caspasas efectoras que participan en la fase tardía de la apoptosis, como la caspasa 3 activa y de igual manera evaluar la fragmentación del ADN como el evento concluyente de este tipo de muerte. Al respecto, cultivos de células tumorales HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con el esteroide y la caspasa 3 activa fue detectada por inmunofluorescencia, mientras que la fragmentación del ADN fue detectada mediante la técnica de TUNEL [Figura 11 A, B y C y Figura 12 A, B y C].

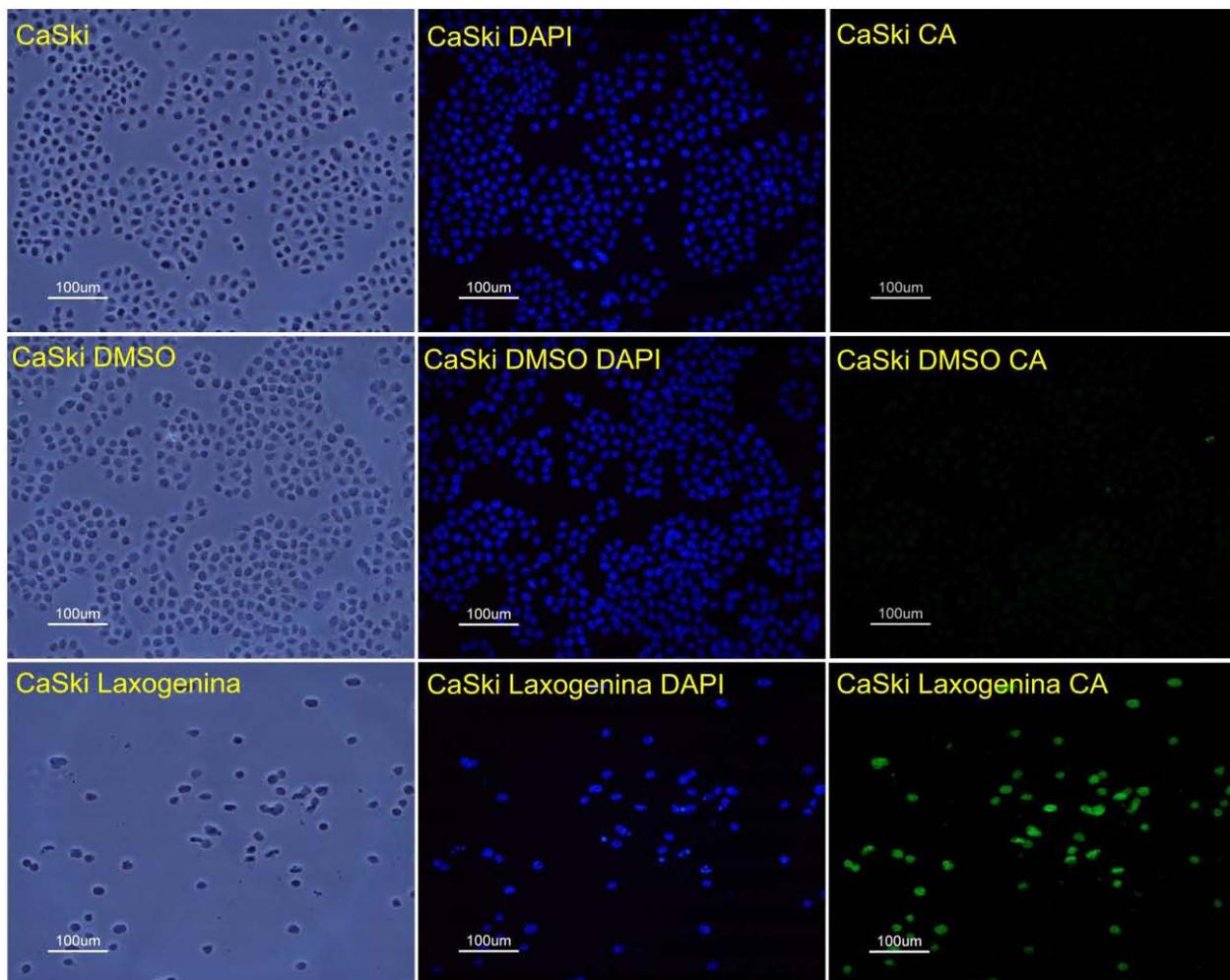
Expresión de caspasa 3 activa

Figura 11 A, B y C.

A



B



C

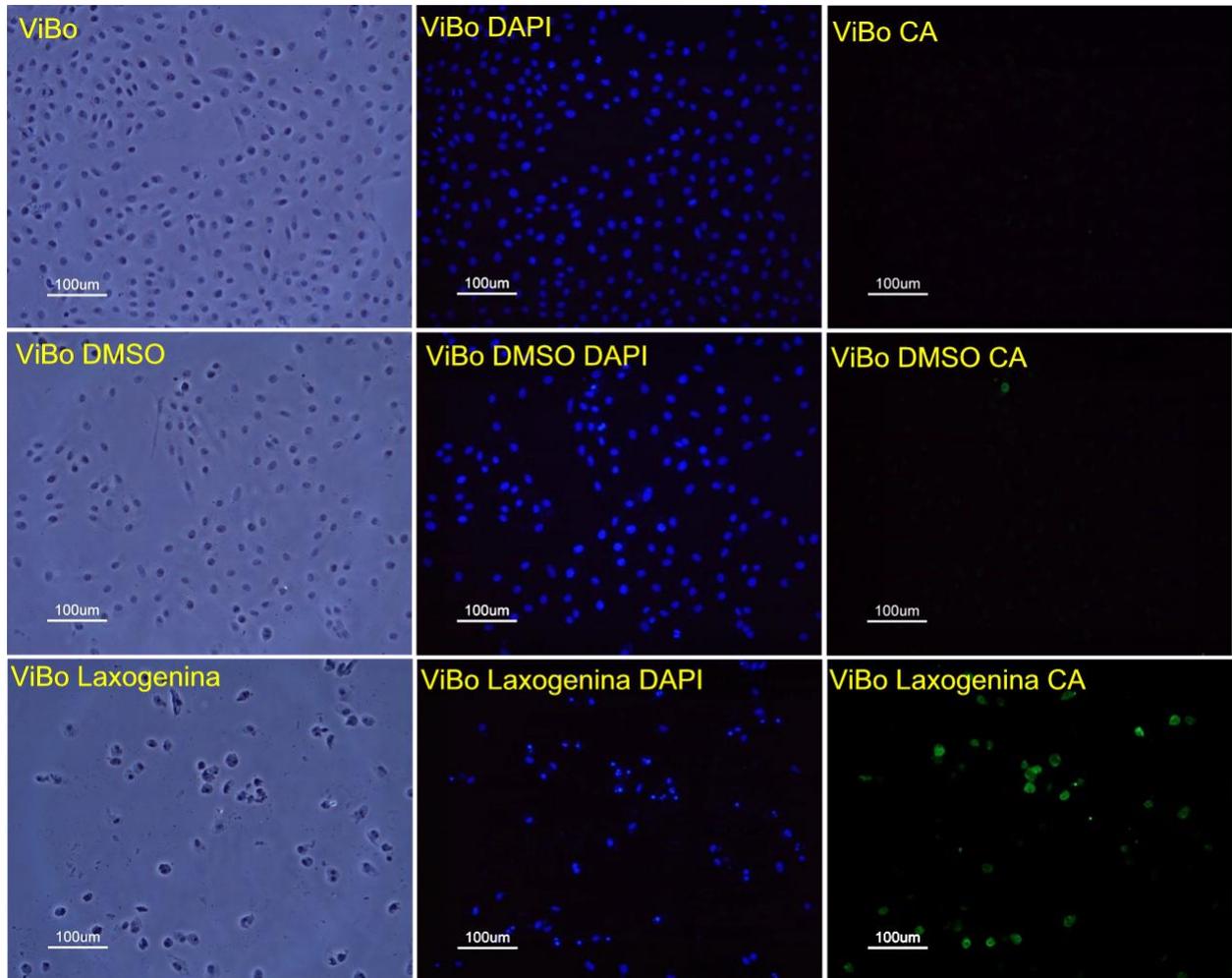
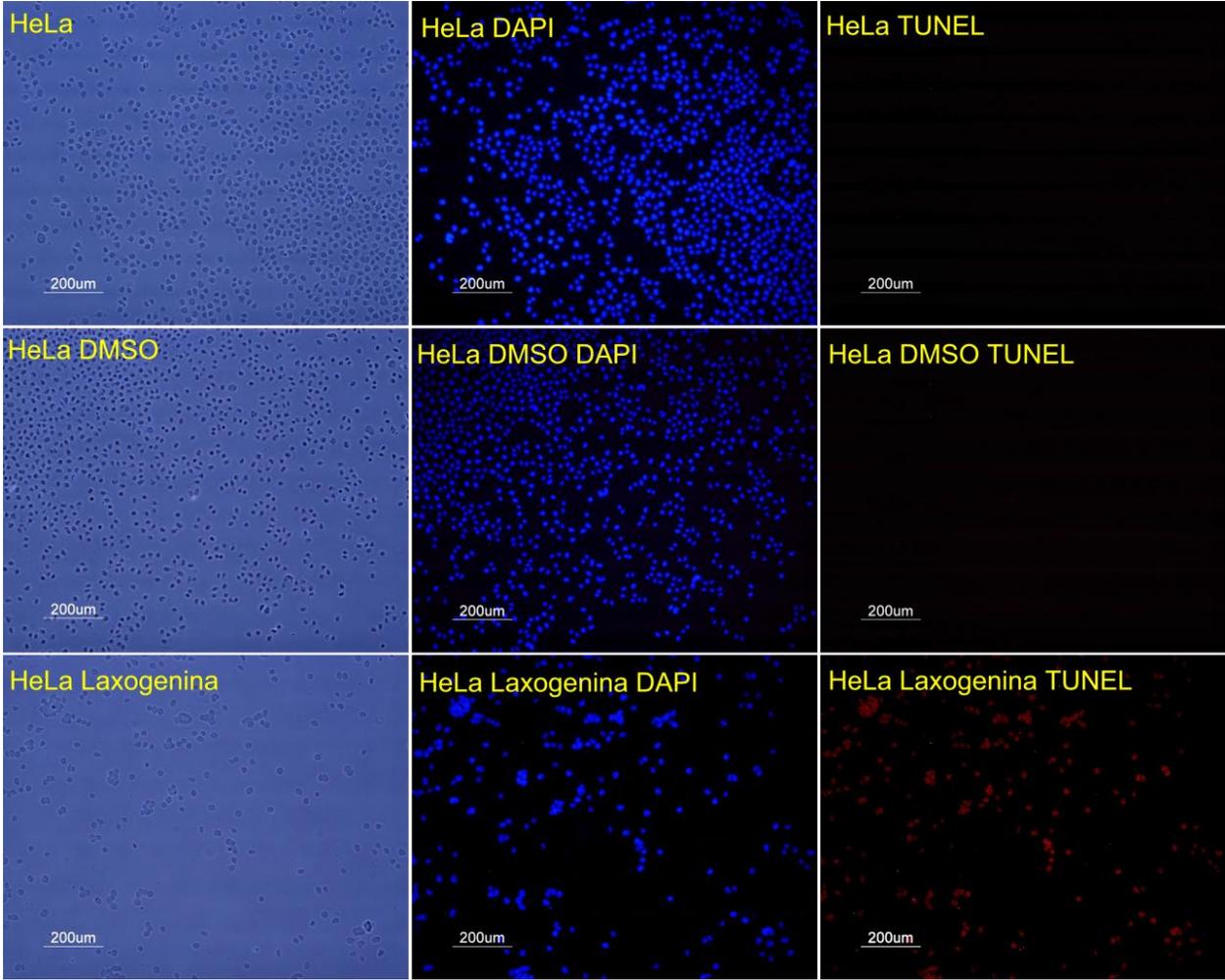


Figura 11 A, B y C. Evaluación de la expresión de caspasa 3 activa en células HeLa, CaSki y ViBo. 250,000 células fueron sembradas en cubreobjetos de $1 \times 1 \text{ cm}^2$, con 2.5 mL de RPMI-1640 al 5% de NCS y tratadas con la respectiva CI_{50} de laxogenina-glicosilada durante 24 h. Las células del control y las células tratadas con DMSO no presentan expresión de caspasa 3, a diferencia de las células tratadas con laxogenina-glicosilada en las que se puede apreciar la fluorescencia en color verde indicando la expresión de caspasa 3 activa.

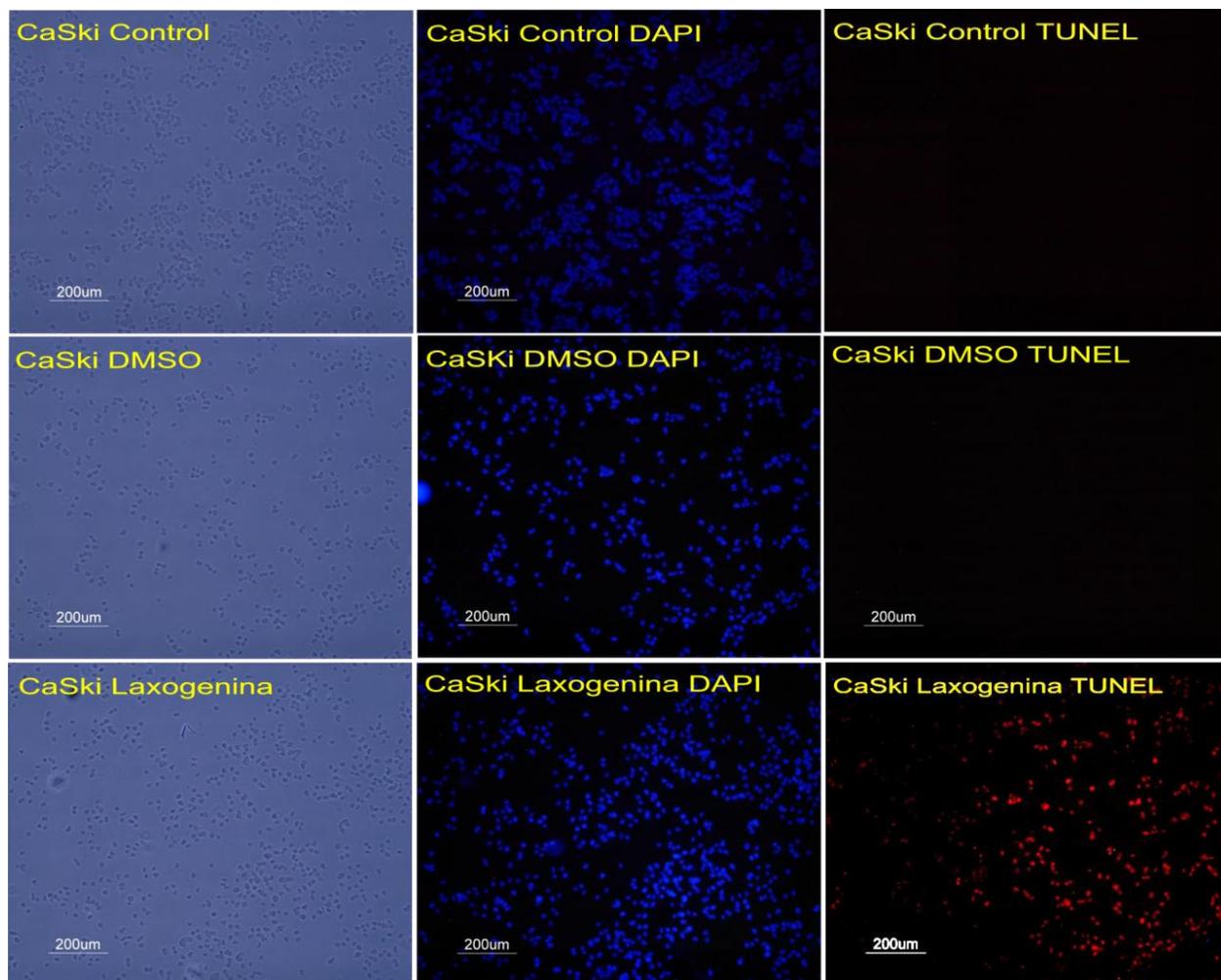
Fragmentación de ADN.

Figura 12 A, B y C.

A



B



C

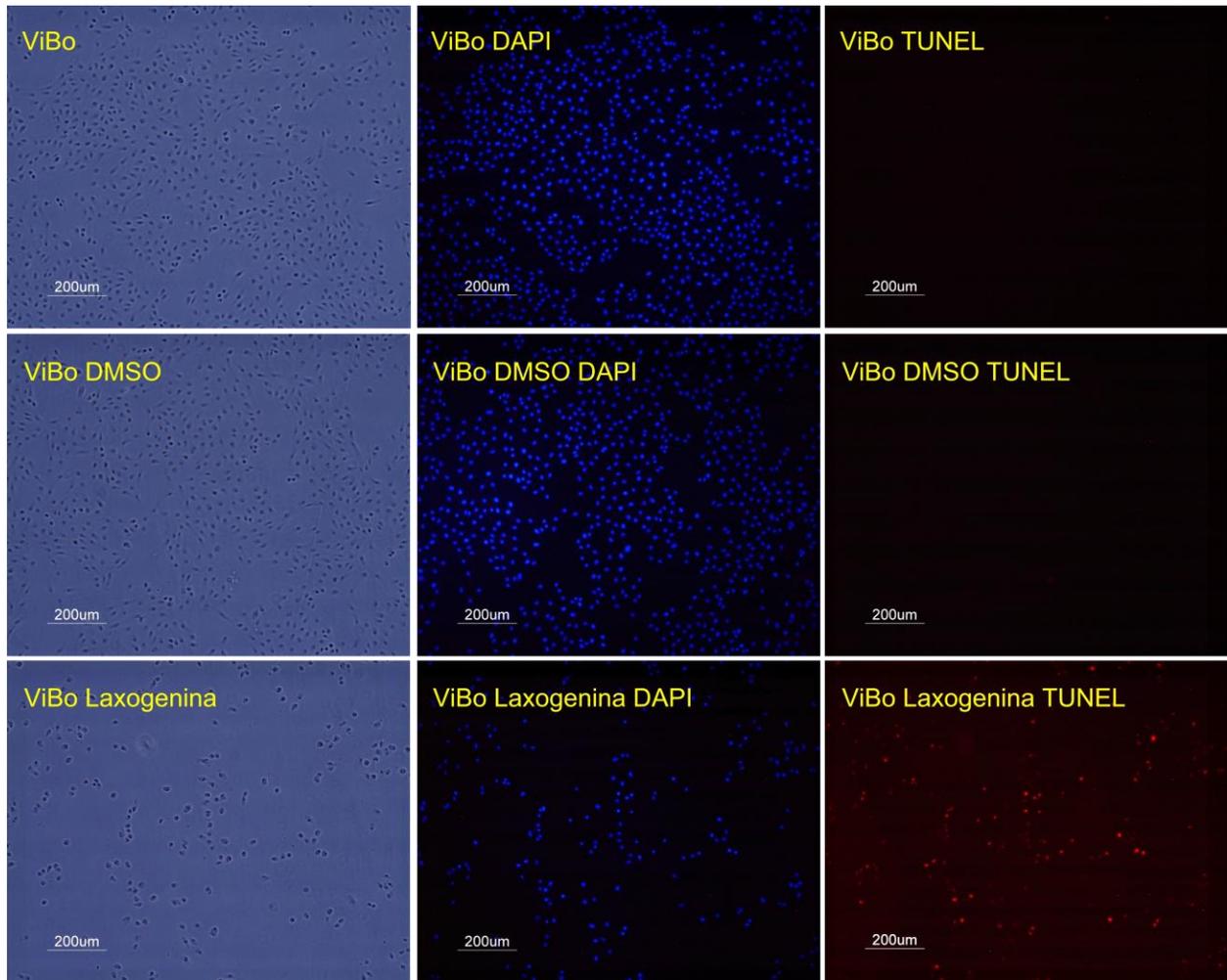


Figura 12 A, B y C. Evaluación de fragmentación de ADN en células HeLa, CaSki y ViBo. 250,000 células fueron sembradas en cubreobjetos de $1 \times 1 \text{ cm}^2$, con 2.5 mL de RPMI-1640 al 5% de NCS y tratadas con la respectiva CI_{50} de laxogenina-glicosilada durante 24 h. Las células del control y las células tratadas con DMSO no presentan fragmentación de ADN, a diferencia de las células tratadas con laxogenina-glicosilada en las que se puede apreciar la fluorescencia en color rojo indicando la fragmentación de ADN.

Como se muestra en las figuras 11 y 12, el fitoesteroide laxogenina-glicosilada induce la expresión de caspasa 3 activa así como la fragmentación de ADN en las tres líneas tumorales provenientes de CaCU, confirmando que el esteroide induce a las células tumorales a una muerte por apoptosis.

Discusión de Resultados

Debido a la diversidad estructural de las saponinas así como a sus múltiples actividades biológicas, éstas son un tema de interés en la investigación científica. Estudios han revelado que la diferencia entre las diversas saponinas, además de otras características e independientemente del tipo y número de azúcares que posean, es respecto a su actividad biológica, ya que compuestos de estructura química similar son capaces de presentar respuestas biológicas diferentes (Sparg *et al.*, 2004). Sin embargo, no se deja atrás la posibilidad de que saponinas con similitud estructural a otras que tienen actividad antitumoral, también puedan mostrar esta característica. Un ejemplo claro es la saponina esterooidal Laxogenina-glicosilada la cual presenta actividad antiproliferativa (Fernández *et al.*, 2009), con una estructura similar a la de las saponinas dioscina, diosgenina, hecogenina, y sarsasapogenina, las cuales han sido descritas con actividades antiproliferativas, necróticas e inductoras de apoptosis (Fernández *et al.*, 2010).

Se ha descrito que la diosgenina posee actividad antiproliferativa en células de leucemia K562 (Liu *et al.*, 2005), en células de osteosarcoma 1547 (Trouillas *et al.*, 2005), entre otras, al igual que la sarsasapogenina en células de carcinoma hepático y la dioscina en células de neuroblastoma SK-N-SH y en células de cáncer de mama MCF-7 (Matthew *et al.*, 2008). Otros estudios reportan que la hecogenina presenta actividad antiproliferativa en células de cáncer cérvico-uterino HeLa, CaSki y ViBo (Fernández *et al.*, 2009), la diosgenina en células CaSki (Fernández *et al.*, 2010) y la dioscina en células HeLa (Matthew *et al.*, 2008), las cuales ejercen su efecto antiproliferativo (CI_{50}) en un rango de concentraciones que van de 29 a 45 $\mu\text{g/mL}$. Con respecto a la laxogenina, su estudio ha sido enfocado principalmente a su síntesis, mientras que el estudio de su actividad biológica es pobre, quizás debido a que es un esteroide fuertemente hidrofóbico que limita su estudio en sistemas acuosos. Sin embargo, en nuestro trabajo se utilizó una laxogenina a la cual se le adicionó una glucosa en el carbono 3, generando un compuesto más soluble y con un rendimiento de síntesis alto. Nuestros resultados muestran que la saponina laxogenina-glicosilada es

capaz de inhibir la proliferación de células de cáncer cérvico-uterino HeLa, CaSki y ViBo, con CI_{50s} que van de 57 - 100 $\mu\text{g/mL}$, acorde con lo reportado por Fernández *et al.*, 2009. Cabe destacar que las líneas celulares HeLa y CaSki son positivas a VPH-18 y 16 respectivamente, mientras que las células ViBo son negativas a VPH, sugiriendo que la línea celular HeLa es la más sensible, mientras que la menos sensible es la línea ViBo. Ésta diferencia en la sensibilidad al compuesto podría estar relacionada con la presencia del VPH y el subtipo de VPH, sin embargo, para confirmar esta relación es necesario probar en por lo menos otras cinco o diez líneas celulares que sean VPH-16 y/o VPH-18 positivas, así como líneas negativas a VPH.

Las CI_{50s} de la laxogenina-glicosilada son relativamente mayores si las comparamos con la dioscina, la hecogenina o la diosgenina; sin embargo, ésta tiene la ventaja de no generar daño necrótico en las células tumorales y no tumorales, a diferencia de los compuestos mencionados anteriormente que han sido reportados con actividad necrótica. Es importante mencionar, que los compuestos utilizados para el tratamiento del cáncer cérvico-uterino en la quimioterapia son fuertemente necróticos, y se le atribuye a esta citotoxicidad la generación de efectos secundarios graves en el paciente. Si la laxogenina-glicosilada no presenta un efecto necrótico tanto en células tumorales como en no tumorales, en el caso de poder ser aplicada como un agente antitumoral, la probabilidad de generar efectos secundarios en los pacientes sería muy baja.

Por otra parte, se ha reportado que la acción antiproliferativa de las saponinas esteroides puede ser dependiente o independiente del ciclo celular, sin embargo, en el caso de la laxogenina-glicosilada, ésta mostró ser dependiente o independiente de ciclo dependiendo de la línea celular, sugiriendo que su acción no está limitada únicamente a células que están ciclando.

Al igual que en otras saponinas como la dioscina, diosgenina, hecogenina entre otras, la laxogenina-glicosilada también indujo a las células tumorales a una muerte por apoptosis, como lo sugiere la observación de cuerpos apoptóticos, la inducción de la

expresión de la caspasa 3 activa así como la detección de ADN fragmentado en las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo. Es importante resaltar que una característica de la muerte celular por apoptosis es la no activación de la respuesta inmune, permitiendo que las células sean eliminadas sin generar un proceso inflamatorio, de tal manera que las células tumorales mueren silenciosamente con la posibilidad de generar efectos secundarios no significativos.

Por otro lado, en la literatura se han descrito una diversidad de compuestos con actividad antitumoral, coincidiendo en la mayoría de ellos en una actividad antiproliferativa o citotóxica, actividad inductora de apoptosis, entre otras, destacando en general un fuerte potencial citotóxico, es decir, la mayor parte de los compuestos inducen a las células tumorales a morir por necrosis. Además, arriba del 90 % de los trabajos donde se reporta la actividad antitumoral de los compuestos, no incluyen pruebas o controles en células no tumorales, dejando sin determinar el efecto del compuesto en células normales así como su verdadero potencial antitumoral. Al respecto, en nuestro trabajo, se destaca que la laxogenina-glicosilada no induce un efecto necrótico en células tumorales con las concentraciones obtenidas para las células HeLa, CaSki y ViBo ni en células linfocíticas (células no tumorales), además, no disminuyó el potencial proliferativo de éstas células, sugiriendo que la laxogenina-glicosilada presenta una actividad antiproliferativa con acción selectiva sin actividad necrótica.

La actividad antiproliferativa y la capacidad selectiva ante células no tumorales que presenta la laxogenina-glicosilada, es una actividad biológica que la perfila como un posible agente con potencial anticancerígeno, y un candidato prometedor para ser evaluado en modelos *in vivo* y así determinar su potencial terapéutico contra el cáncer.

Conclusiones

- La concentración de la saponina estroidal laxogenina-glicosilada a la cual disminuye la densidad celular en un 50% de las células HeLa, CaSki y ViBo es de 57, 71 y 100 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.
- El efecto de la laxogenina-glicosilada en las líneas CaSki y ViBo es dependiente del ciclo celular, mientras que para la línea HeLa es independiente del ciclo.
- La laxogenina-glicosilada induce muerte por apoptosis en las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo a través de la caspasa 3 activa.
- La laxogenina-glicosilada aplicada a las concentraciones de 57, 71 y 100 $\mu\text{g/mL}$, no reduce el potencial proliferativo de cultivos de linfocitos humanos no tumorales.
- La laxogenina-glicosilada no induce muerte necrótica en células tumorales y células no tumorales.

Referencias

- Alberts Bruce, Bray D., Lewis J., Raff M., Raberts K. y Watson J.D. (2004). *Biología Molecular de la Célula*. 2ª edición. Garland Publishing, Inc. New York.
- Baba M., Ohmura M., Kishi N., Okada Y., Shibata S., Peng J., Yao S.-S., Nishino H., Okuyama, T. (2000). Saponins isolated from *Allium chinense* G. Don and antitumor-promoting activities of isoliquiritigenin and laxogenin from the same drug. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 23, 660–662.
- Becker Wayne M., Kleinsmith Lewis J., Hardin Jeff. (2007). *El Mundo de la Célula*. 6a edición. Pearson Addison Wesley. Madrid.
- Bolsover Stephen R., Hyams J.S., Shephard E.A., White H. A. y Widemann C.G. (2004). *Biología Celular*. John Wiley and Sons, Inc. Hoboken, New York.
- Cameron R. (2005). *Oncología Práctica*. Panamericana. Barcelona.
- Fernández Herrera M. A., Sandoval Ramírez Jesús., López Muñoz Hugo., Sánchez Sánchez Luis. (2009). Formation of the steroidal 3 β -hydroxy-6-oxo-moiety. Synthesis and cytotoxicity of glucolaxogenin. *General Papers ARKIVOC XIII*, 170-184.
- Hong-Ji Q., Jyunichi K., Ken H., Xing-Ri C., Yasunori I., Seiichi K., Fusao K y Setsuo S. (2006). Reactions of 26-Iodopseudodiosgenin and 26-Iodopseudodiosgenone with various nucleophiles and pharmacological activities of the products. *Chem Pharm Bull*, 54:72-79.
- Hostettmann K. y Marston A. (1995). *Saponin. Chemistry and Pharmacology of Natural Products*. Cambridge University Press. New York.
- INEGI. Consulta virtual de datos. Estadísticas de mortalidad. Consultada el 4 de febrero de 2011. www.inegi.gob.mx.
- Jiménez Luis Felipe y Merchant Horacio. (2003). *Biología Celular y Molecular*. Prentice Hall. México.
- Klug William S., Cummings M.R., y Spencer C.A. (2006). *Conceptos de Genética*. 8ª edición. Prentice Hall. Madrid.

- Liu G. Y., Frank N., Bartsch H. & Lin J. K. (1998). Induction of Apoptosis by Thiuramdisulfides, the Reactive Metabolites of Dithiocarbamates, through Coordinative Modulation of NF κ B, c-fos/c-jun, and p 53 Proteins. *Molecular Carcinogenesis*, 22, 235-246.
- Mann J., Davidson R. S., Hobbs J. B., Banthorpe D. V., Harborne J. B. (1994). *Natural Products. Their Chemistry and Biological Significance*. Longman Scientific & Technical. Essex. New York.
- Marker R. E. y Krueger J. (1940). The preparation of trillin and its conversion to progesterone. *J. Am. Chem. Soc.* 62, 3349-3350.
- Matthew J. Kaskiwa Mary Lynn Tassottob, John Th'nga, Zi-Hua Jianga. (2008). Synthesis and cytotoxic activity of diosgenyl saponin analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 6, 3209–3217.
- Ming-Jie L., Zhao W., Yong J., Ngok-Shun W y Qing-Yu W. (2005). Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemia K562 cells with the disruption of Ca²⁺ homeostasis. *Can Chem Pharm*, 55:79-90.
- Okanishi T., Akahori, A., Yasuda F. (1965). Studies on the steroidal components of domestic plants. XLVII. Constituents of the stem of *Smilax sieboldi* Miq. (1). The structure of laxogenin. *Chem Pharm Bull*, 13(5):545-50.
- OMS. Consulta virtual de datos. Estadísticas de mortalidad 2009. Consultada el 4 de febrero de 2011. www.who.int/es.
- Paniagua Gómez-Álvarez R., Nistal Martín De Serrano M., Sesma Egozcue P., Álvarez-Uria Rico-Valdemoro M., Fraile Laiz B., Anadón Álvarez R., Sáez Crespo F. J. (2007). *Biología Celular*. 3ª edición. Mc Graw-Hill Interamericana. Madrid.
- Pui-Kwong C. (2007). Acylation with diangeloyl groups at C21-22 positions in triterpenoid saponins is essential for cytotoxicity towards tumor cells. *Biochemical Pharmacology*, 73:341-350.
- Robaina Rodríguez C. M., Teixeira-Zullo M. A., Müller Queiróz H., de Burgos M., Alonso Becerra E., Coll Manchado F., Polish J. (2006). *Med. Chem*, 80, 637-646.

- Sánchez Socarrás V. (2001). Mecanismos reguladores de la muerte celular no necrótica. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*, 20:266-274.
- Sparg S. G., Light M. E., Van Staden J. (2004). Review Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94, 219–243.
- Stevens A. y Lowe J. (2001). *Anatomía Patológica*. 2ª edición. Elsevier. España.
- Tobarí A., Teshima M., Koyanagi J., Kawase M., Miyamae H., Yoza K., Takasaki A., Nagamura Y., Saito S., Eur J. (2000). Spirostanols obtained by cyclization of pseudosaponin derivatives and comparison of anti-platelet agglutination activities of spirostanol glycosides. *Med. Chem*, 35, 511-527.
- Trouillas P., Corbière C., Liagre B., Duroux J. y Beneytout J. (2005). Structure function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma cells: a molecular modelling approach of natural molecules structurally close to diosgenin. *Bioorg. Med. Chem*, 13: 1141-1149.
- Woo M. H., Do J. C., Son K. H. J. (1992). Five new spirostanol glycosides from the subterranean parts of *Smilax*. *Nat. Prod*, 55, 1129-1135.
- Yamasaki Y., Ito K., Enomoto Y., Sutko J. L. (1987). Alterations by saponins of passive calcium permeability and sodium-calcium exchange activity of canine cardiac sarcolemmal vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 897:481-487.
- Yu B. y Tao H. J. (2002). Glycosyl Trifluoroacetimidates. 2. Synthesis of Dioscin and Xiebai Saponin I. *Org. Chem*, 67, 9099-9102.

Apéndice

- Medio de cultivo.

RPMI-1640 (GIBCO, USA) 10.42 g

NaHCO₃ (SIGMA, USA) 2 g

Los reactivos se disuelven en 800 mL de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1N y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 22 µm. Se almacena a 4°C. El medio de cultivo se complementa con suero de neonato de ternera (NSC), en la proporción requerida y posteriormente es nuevamente filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 22 µm.

- Desactivación del suero.

Una botella de suero de neonato de ternera (NCS) se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se coloca a baño maría a 57 °C durante 30 min. Posteriormente es trasvasado en alícuotas de 50 mL. para su mejor uso y manipulación.

- Solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

Se utiliza para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato. Los componentes se diluyen en un volumen final de 1 L de agua bidestilada.

Cloruro de sodio (SIGMA, USA) 8.00 g

Cloruro de potasio (SIGMA, USA) 0.20 g

Fosfato monoácido de sodio (SIGMA, USA) 2.16 g

Fosfato diácido de potasio (SIGMA, USA) 0.20 g

Se ajusta el pH a 7.2 - 7.4 utilizando HCl 8 N y se afora finalmente a un volumen final de 1000 mL. Ésta solución se esteriliza por medio de filtros de membrana (Millipore) con diámetro de poro de 22 µm, la solución se almacena a 4 °C hasta el momento del uso.

- Verseno.

Ésta solución se empleó para despegar las células tumorales HeLa y ViBo adherentes, y funciona como agente quelante que secuestra iones de calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación se utilizan las siguientes sustancias:

EDTA (SIGMA, USA) 0.4 g
NaCl (SIGMA, USA) 8 g
KCl ((SIGMA, USA) 0.4 g
Tris (SIGMA, USA) 3.04 g

Los reactivos se disuelven en 800 ml. de agua bidestilada, que ajusta al pH a 7.7 con HCl 1 N y se afora a 1000 mL de agua bidestilada. La solución se esteriliza en autoclave a 20 lbs durante 20 min.

- Solución Tripsina.

Ésta solución se empleó para despegar las células ViBo, es preparada al 0.05% en Verseno.

- Solución cristal violeta (0.1 %).

Para preparar 500 ml de cristal violeta en una concentración 0.1 % se requiere previamente preparar una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM con un pH 6. Posteriormente se adiciona el cristal violeta, se diluye y se filtra usando papel Whatman número 2. Se almacena a temperatura ambiente.

NaOH (SIGMA, USA) 3.96 g
Ácido Fórmico (SIGMA, USA) 4.28 mL
Cristal violeta (SIGMA, USA) 1 g

- Colorante Cristal Violeta.

La solución de cristal violeta se prepara al 0.1 % en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM pH 6, la cual consiste en agregar 3.96 g de NaOH y 4.28 mL de ácido fórmico aforados a 500 mL con agua bidestilada. Una vez preparada la solución debe ser filtrada.

- Glutaraldehído.

A 1.57 mL de glutaraldehído (70 % v/v) se le agrega 98.43 mL de agua bidestilada y se almacena a una temperatura de 4 °C.

- Solución de ácido acético (10 %).

A 10 mL de ácido acético glacial (J. T. Baker) se le agrega 90 mL de agua bidestilada.

- Paraformaldehído (2%).

Paraformaldehído al 2% en PBS, se disuelve a baño María sin que la temperatura rebase los 60 °C. Se almacena a 4 °C.